

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



**APLICACIONES BIOMÉDICAS DE  
MATERIALES NANOPARTICULADOS  
BASADOS EN SÍLICE Y EN ORO**

**VIRGINIA CEBRIÁN HERNANDO**

**MADRID, 2012**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**APLICACIONES BIOMÉDICAS**  
**DE MATERIALES NANOPARTICULADOS**  
**BASADOS EN SÍLICE Y EN ORO**

Memoria presentada por Virginia Cebrián, Licenciada en Biología y  
Bioquímica, para optar al grado de Doctor

Directores

Dra. Nuria E. Vilaboa Díaz

Dr. Francisco Manuel Martín-Saavedra

Hospital Universitario la Paz, IdiPAZ

Madrid, 2012

**NURIA E. VILABOA DÍAZ**, Doctora en Farmacia, Investigadora del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

**FRANCISCO MANUEL MARTÍN-SAAVEDRA**, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

**CERTIFICAN:**

Que **Virginia Cebrián Hernando**, Licenciada en Ciencias Biológicas y Bioquímicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Aplicaciones biomédicas de materiales nanoparticulados basados en sílice y en oro”, que presenta como Tesis Doctoral.

Madrid, 5 de Noviembre de 2012

Nuria E. Vilaboa Díaz

Francisco M. Martín-Saavedra

Este trabajo se ha llevado a cabo mediante financiación concedida por los siguientes organismos: Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, Fundación Ramón Areces, Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2006-12948-C04-02, MAT2009-14695-C04-02 y CIT-420000-2008-17), Comunidad de Madrid, CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) y Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz.

*A mis padres*



*“Si he conseguido ver más lejos,  
es porque me he aupado en hombros de gigantes”*

*(Isaac Newton)*





## ***AGRADECIMIENTOS***



La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, han participado varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniendo paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Nuria Vilaboa, codirectora de esta tesis, que me abriera las puertas de su grupo de investigación hace ya cinco años. Por haber confiado en mí, por la paciencia y por la dirección de este trabajo. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades necesarias para el desarrollo de esta tesis. Gracias Nuria por tu apoyo.

Al Dr. Francisco M. Martín-Saavedra, Pachi, mi codirector. No te imaginas el orgullo que siento por ser tu primera doctoranda. Gracias por estar siempre ahí, incluso cuando nos separaban miles de kilómetros. Por tu infinita paciencia, tus consejos, tu ayuda... Eres un modelo científico a seguir.

Al Dr. Jesús Santamaría y al Dr. Manuel Arruebo por su apoyo y colaboración a lo largo de estos años. Quiero agradecerles su predisposición constante para ayudarme y por aclarar mis dudas. Quisiera hacer extensivo este agradecimiento a su grupo de investigación del INA, con los que he colaborado estrechamente en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo y amistad. A Fátima, por estar siempre disponible en los momentos difíciles, no tengo ninguna duda de que sin ti algún clon habría acabado conmigo. A Alicia, mi compañera de fatigas, juntas hemos recorrido este largo viaje de la Tesis aunque al final me tomaste la delantera. A Lara, nuestra última incorporación aunque no por eso menos importante, gracias por tener siempre una palabra de ánimo. A Arancha, gracias por tus consejos, tu gran sentido del humor y por hacerme ver el lado positivo de las cosas cuando era incapaz de encontrarlo. A Alba, por enseñarme los secretos del laboratorio. Quiero agradecer muy especialmente a Laura y Gema, por permitirme formar parte de vuestra vida dentro y fuera del laboratorio, gracias por ser como sois y por compartir conmigo tantos buenos momentos, y los que espero nos queden por vivir.

Gracias también a mis compañeros de la Unidad de investigación, que me recibieron con los brazos abiertos y me apoyaron durante estos cinco años: Virginia, Yolanda, Peque, Marta, Iker, Rocío... A Susana, nuestra “secre” por hacerme el mundo del papeleo mucho más sencillo durante estos años. Al Dr. Luis Álvarez por estar en los momentos difíciles y prestarme su ayuda siempre que la he necesitado. A la Dra. De Miguel por poner a nuestra disposición su experiencia en la interpretación de imágenes

de microscopía electrónica. Quisiera agradecer también al Servicio de Microscopía Electrónica de la UAM, por sus sugerencias y su excelente apoyo técnico.

A todas aquellas personas que creyeron en mí desde el primer día que decidí estudiar Biología en la Universidad SEK de Segovia, entre ellos quiero destacar al Dr. Samuel González-Mancebo, y a los que lo hicieron en mi paso por la Universidad de Navarra, Dra. Pilar Sesma, Dr. Rafa Miranda, Dra. Marina García y Dr. José Luis Vizmanos, gracias por vuestro apoyo y consejos.

A aquellos amigos que han compartido conmigo los “ires y venires” en el plano personal y académico durante mi etapa universitaria en Segovia: Edu, Alicia, Laura, Bea, Paula, Judith, Silvia..., durante mi etapa en Pamplona: Almudena, Javi, Iker, Olatz, Alex, Garbi, Idoias... y por último, durante mi etapa madrileña: Carol, Mónica y Pima.

Agradezco también a todo el mundo no científico que me ha hecho mucho más llevaderos estos años de Tesis. A mis niñas del comodín: Conchi, Sofía, Gema, Silvia... y por supuesto a mis queridos peregrinos: Otto, Ander, Mayte, Bea, Jose, Raúl, menudas terapias de grupo hemos hecho durante estos años, la verdad es que formamos un buen equipo. En especial a Yoly y a Sara, mis amigas de siempre, mis hermanas, muchas gracias por todos los momentos que hemos vivido, tanto los buenos como los malos que siempre son mejores con vosotras.

A Rodrigo, sin lugar a dudas, lo mejor que me ha pasado durante estos años de Tesis es haberte conocido. Gracias por compartir tu vida conmigo y por tu apoyo constante. Juntos podremos con todo.

A mi familia, mis abuelos, tíos y primos que siempre han confiado en mí y me han apoyado en los momentos difíciles. A Jandri y a Marisol, mis segundos padres, gracias a vosotros mis compañeros saben lo que son unos buenos nevaditos y las comidas caseras. Y en especial a mi padre y a mi madre por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en mi educación, tanto académica como de la vida, por su apoyo incondicional a lo largo del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a vosotros. Os quiero.

## ***RESUMEN***



Morfología, tamaño, densidad de carga y estabilidad coloidal son propiedades físicas de las nanopartículas (NPs) que determinan su eficacia como agentes de transfección. En este trabajo se ha estudiado la influencia en la capacidad de transfección de NPs de sílice mesoporosa (MSN) de su funcionalización superficial con aminas primarias, cuaternarias, cíclicas o polímeros catiónicos. La estabilidad coloidal de estos materiales en medios fisiológicos se relacionó con su capacidad para transfectar células humanas, demostrando la importancia de la agregación y la carga superficial. La funcionalización de las MSN con el polímero catiónico polietilenimina (PEI) otorgó una carga superficial positiva que permitió la unión efectiva de plásmidos y promovió un estado de aglomeración de los conjugados MSN-PEI/ADN que permitía su internalización celular, resultando en una eficiente transfección. Por otro lado, se investigó el efecto del tamaño de las NPs sobre la transferencia génica. Para ello, se sintetizaron y caracterizaron dos especies de NPs de oro funcionalizadas con PEI (GNPs-PEI), con distribución de tamaño en torno a 6 nm (GNPs-PEI < 10 nm) o 70 nm (GNPs-PEI < 100 nm), respectivamente, que se emplearon para transfectar una variedad de plásmidos en células humanas. Mientras que las GNPs-PEI < 100 nm fueron incapaces de transfectar, las GNPs-PEI < 10 nm actuaron como agentes de transferencia génica eficientes. El éxito de las GNPs-PEI < 10 nm como vectores de transfección se relacionó con mecanismos de escape endosomal del ADN.

La posibilidad de modificar la geometría y la composición de las GNPs permite la preparación de nanoestructuras plasmónicas capaces de absorber luz en la región del infrarrojo cercano (NIR) y convertirla en calor (NIR-NPs). En este trabajo se ha explorado el comportamiento fototérmico de tres tipos de NIR-NPs: *nanoshells* (NS), GNPs huecas (HGNPs) y *nanorods* acoplados a metil-polietilenglicol-tiol (NRs-mPEG). Tras la incubación de células humanas con las NIR-NPs seguida de irradiación NIR, se encontraron marcadas diferencias en su termoeficiencia debido a una interacción asimétrica de los materiales con el ambiente biológico. Se exploró la habilidad de las especies más eficientes térmicamente, NS y HGNPs, para modular la expresión de transgenes controlados por el promotor del gen termosensible humano *HSP70B*. Los resultados indicaron que los niveles de expresión del gen testigo DsRed-Monómero o la citotoxicidad del gen antiproliferativo FMG-GALV aumentaban en función de la concentración del nanomaterial y de la duración de la exposición al láser NIR. La combinación de hipertermia óptica con la expresión de FMG-GALV incrementó la muerte celular como resultado de la sinergia establecida.





## ***SUMMARY***



The physical properties of nanoparticles (NPs), including morphology, size, charge density and colloidal stability, are important parameters that determine their overall efficacy as vectors for gene delivery. In this work, we studied the influence of functionalization with primary amines, quaternary amines, quaternized cyclic amines or cationic polymers in the transfection efficiency of mesoporous silica NPs (MSN). The colloidal stabilities presented by these nanomaterials in physiological buffers were related to their efficiency as transfection reagents in human cells, demonstrating the importance of the agglomeration and the surface charge during gene transfer. Positive electrostatic charge rendered by cationic polymer polyethylenimine (PEI) on the surface of MSN facilitated plasmid adsorption and promoted a state of aggregation of MSN-PEI/DNA conjugates that allowed their cell internalization and resulted in effective transfection. On the other hand, we have investigated the effect of NPs size on gene delivery. To this end, two sets of gold NPs functionalized with PEI (GNPs-PEI), having particle size distributions centered at about 6 nm (GNPs-PEI < 10 nm) or 70 nm (GNPs-PEI < 100 nm), respectively, were prepared, characterized and used to transfect a variety of plasmids into human cells. We have demonstrated that GNPs-PEI < 10 nm were able to transfect, while gene delivery could not be achieved with GNPs-PEI < 100 nm. The success of GNPs-PEI < 10 nm as non-viral transfection vectors was related to mechanisms of endosomal escape of DNA.

The possibility of modifying the geometry and the composition of GNPs allows the preparation of plasmonic nanostructures capable of absorbing near-infra-red (NIR) light radiation and transforming it into heat (NIR-NPs). For this study we explored the photothermal behavior of three types of NIR-NPs: silica-gold nanoshells (NS), hollow GNPs (HGNPs) and methylpolyethyleneglycol-thiol coated gold nanorods (NRs-mPEG). After incubation of human cells with the nanostructures followed by NIR light irradiation, we found marked differences in the developed thermoefficiencies owing to an asymmetric interaction of the nanomaterials with the biological environment. We explored the ability of the species most thermally efficient, NS and HGNPs, to tune the expression of transgenes driven by the promoter of the highly heat-inducible human *HSP70B* gene. The results indicated that the expression levels of the reporter DsRed-Monomer gene or the cytotoxicity of the antiproliferative FMG-GALV gene increased as a function of the concentration of the nanomaterial and length of laser exposure. Combination of photothermia and FMG-GALV expression dramatically increased cell killing as a result of the synergistic activity established.



## ***ÍNDICE***



---

ABREVIATURAS .....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. NANOTECNOLOGÍA .....	7
2. MATERIALES NANOESTRUCTURADOS: NANOPARTÍCULAS .....	7
3. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS NPs .....	10
3.1 Transferencia génica .....	10
3.1.1 Nanopartículas basadas en sílice mesoporosa .....	14
3.1.2 Nanopartículas basadas en oro .....	17
3.2 Hipertermia.....	19
3.2.1 Nanopartículas basadas en oro .....	24
3.2.1.1 <i>Nanoshells</i> de oro.....	24
3.2.1.2 Nanopartículas de oro huecas .....	25
3.2.1.3 <i>Nanorods</i> de oro.....	25
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
1. NANOPARTÍCULAS ENSAYADAS .....	33
1.1 MSN .....	33
1.2 GNPs .....	34
1.3 NIR-NPs BASADAS EN ORO.....	35
1.3.1 NS .....	35
1.3.2 HGNPs.....	36
1.3.3 NRs acoplados a metil-polietilenglicol-tiol.....	37
1.4 Caracterización de las NPs y los complejos NPs/ADN .....	37
2. CULTIVOS CELULARES.....	39
2.1 Establecimiento de líneas celulares estables a partir de células Saos-2.....	39
2.2 Establecimiento de líneas celulares estables a partir de células HeLa.....	40
3. TRATAMIENTOS CELULARES .....	41

4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD METABÓLICA .....	42
5. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN TRANSITORIA CON NPs.....	43
6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	44
7. MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER DE BARRIDO.....	45
8. ENSAYOS DE HIPERTERMIA ÓPTICA .....	46
8.1 Excitación fototérmica de las NIR-NPs .....	46
8.2 Tratamiento fototérmico con laser NIR de células humanas .....	46
8.3 Ablación fototérmica mediante irradiación NIR.....	47
8.4 Expresión transgénica inducida mediante las NIR-NPs.....	47
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	48
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
1. OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN DE MSN MEDIANTE FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL.....	51
1.1 Caracterización de las MSN funcionalizadas.....	51
1.2 Influencia de la funcionalización superficial de las MSN sobre la eficiencia de transfección de células humanas .....	54
2. OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN DE GNPs MEDIANTE FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA .....	59
2.1 Caracterización de las GNPs .....	59
2.2 Influencia de la funcionalización superficial y el tamaño de las GNPs sobre la eficiencia de transfección de células humanas.....	62
2.3 Estudio de los mecanismos de internalización de las GNPs funcionalizadas en células humanas.....	68
2.4 Inducción de la expresión del gen terapéutico HSV1tk mediante transfección con las GNPs funcionalizadas .....	73
3. CAPACIDAD DE NIR-NPs BASADAS EN ORO PARA GENERAR HIPERTERMIA ÓPTICA EN CÉLULAS HUMANAS.....	74
3.1 Caracterización de las NIR-NPs.....	74
3.2 Estudio de los mecanismos de internalización de las NIR-NPs en células humanas.....	78



3.3 Evaluación de la capacidad de las NIR-NPs para dirigir tratamientos fototérmicos en células humanas.....	80
3.4 Inducción de expresión transgénica mediante tratamiento fototérmico mediado por NIR-NPs.....	84
3.5 Inducción de la expresión del gen terapéutico FMG-GALV mediante tratamiento fototérmico mediado por NIR-NPs .....	90
<i>DISCUSIÓN</i> .....	95
1. OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN DE MSN MEDIANTE FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL.....	97
2. OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN DE GNPs MEDIANTE FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA .....	100
3. CAPACIDAD DE NIR-NPs BASADAS EN ORO PARA GENERAR HIPERTERMIA ÓPTICA EN CÉLULAS HUMANAS.....	104
<i>CONCLUSIONES</i> .....	109
<i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	113
<i>APÉNDICE</i> .....	137



## ***ABREVIATURAS***



**ADE:** Agente director de la estructura

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**AMF:** Campo magnético alterno

**ARN:** Ácido ribonucleico

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**DCE:** Diámetro del círculo equivalente

**DMEM-FBS:** Medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino

**EGFP:** Proteína verde fluorescente

**EPR:** Efecto de permeabilidad y retención aumentada

**FMG-GALV:** Forma hiperfusogénica de la glicoproteína de membrana del virus de la leucemia de gibbon

**FS:** Solución de fosfato sódico 50 mM, pH = 7,4

**GCV:** Ganciclovir

**GNPs:** Nanopartículas de oro

**GNPs-PEI:** Nanopartículas de oro funcionalizadas con polietilénimina

**HGNPs:** Nanopartículas de oro huecas

**HSF:** Factor de transcripción de choque térmico

**HSE:** Elemento de choque térmico

**HSP:** Proteína de choque térmico

**HSV1tk:** Tirosina quinasa del virus herpes simple tipo 1.

**IP:** Yoduro de propidio

**MCLB:** Microscopía confocal láser de barrido

**MET:** Microscopía electrónica de barrido

**MSN:** Nanopartículas de sílice mesoporosa

**MSN-NH<sub>2</sub>:** Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con grupos amino

**MSN-NH<sub>2</sub>-PDDA:** Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con grupos amino y recubiertas con poli(dialildimetilamonio)

**MSN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:** Nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con grupos amonio

**MSN-PEI:** Nanopartículas de sílice mesoporosa recubiertas con polietilenimina

**NIR:** Infrarrojo cercano

**NIR-NPs:** Nanopartículas de oro con capacidad de absorción en la región del infrarrojo cercano

**NPs/ADN:** Complejos compuestos por nanopartículas con ácido desoxirribonucleico adsorbido

**NPs:** Nanopartículas

**NRs:** *Nanorods*

**NRs-mPEG:** *Nanorods* recubiertos con metil-polietilenglicol-tiol

**NS:** *Nanoshells*

**PBS:** Solución salina tamponada de fosfato

**PCS:** Espectroscopía de correlación fotónica

**PDDA:** Poli(dialildimetilamonio)

**PEI:** Polietilenimina

**RF:** Radiofrecuencia

**SPR:** Resonancia localizada de plasmón de superficie

**SWNT:** Nanotubos de carbono de pared única

## ***INTRODUCCIÓN***





## **1. NANOTECNOLOGÍA**

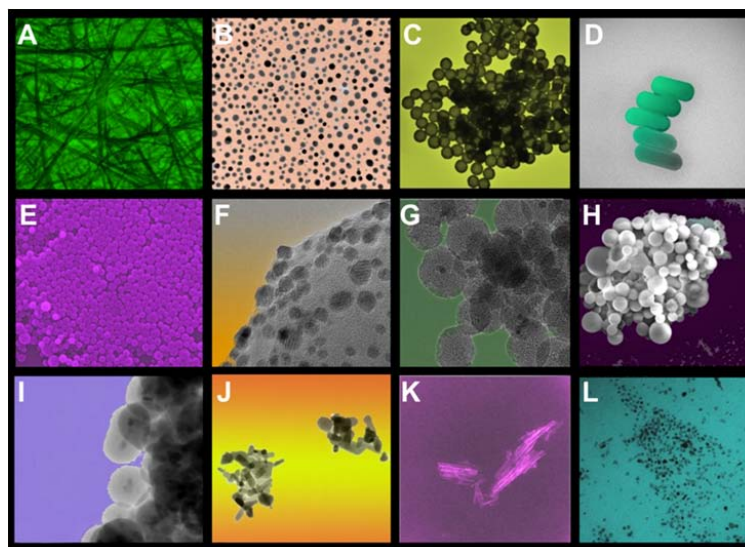
La nanotecnología se refiere a la investigación y el desarrollo tecnológico a escalas atómica, molecular y macromolecular, permitiendo la manipulación y el estudio controlado de estructuras con un tamaño en el rango de 1 a 100 nm (Gao y Xu, 2009). La nanobiotecnología, en la que convergen nanotecnología y biotecnología, es la rama de la nanotecnología que se perfila con mayor potencial debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas (Fakruddin y col., 2012). Dentro de la nanobiotecnología se investiga en campos como la microfluídica, biosensores, microvectores y microingeniería de tejidos (Gourley, 2005). Muchas de estas disciplinas se integran para crear sistemas capaces de transportar, manipular, detectar y procesar moléculas biológicas, orgánulos o células. Las oportunidades que ofrece la nanobiotecnología son realmente excepcionales, ya que la superposición de biotecnología, nanotecnología y tecnología de la información está permitiendo el desarrollo de innovaciones tecnológicas que desempeñen un papel vital no sólo en la administración de fármacos y terapia génica, sino en imagen molecular y en el desarrollo de biomarcadores y biosensores (Ernest y Shetty, 2005).

En la actualidad, algunas aplicaciones de la nanobiotecnología están empezando a introducirse en la práctica de la medicina convencional. La nanobiotecnología permite el diseño de fármacos con el objetivo de aumentar la eficiencia de liberación y reducir su toxicidad. Además, proporciona herramientas moleculares como biosensores, cuyo tamaño es mucho menor que el de una célula humana para la detección rutinaria de partículas individuales de virus o bacterias en muestras minúsculas. El análisis de tejidos a nivel molecular proporciona información detallada de las actividades celulares, subcelulares y moleculares, lo que permite la elaboración de tratamientos específicos y adecuados a cada patología (Jain, 2008).

## **2. MATERIALES NANOESTRUCTURADOS: NANOPARTÍCULAS**

Una de las capacidades más importantes de la nanotecnología es la preparación y desarrollo de nanopartículas (NPs) (Martin y Mitchel, 1999; Nalwa, 1999). Las NPs son materiales que cuentan con al menos una dimensión situada en el rango de la escala nanométrica, inferior a los 100 nm (Abu-Salah y col., 2010). Existe una gran variedad de técnicas para la preparación de diferentes tipos de NPs (Kelsall y col., 2005; Chan y

Nie, 1998; Santra y col., 2001). Según la naturaleza del material de partida para su síntesis, las NPs pueden clasificarse en dos grandes grupos: NPs orgánicas e inorgánicas (Destrée y Nagy, 2006). Las NPs inorgánicas se basan en diferentes materiales no metálicos como el carbón (Bianco y col., 2005) y el silicio (Kneuer y col., 2000), o en materiales metálicos como el oro (Thomas y Klibanov, 2003), la plata (Ahamed y col., 2010) y los óxidos de hierro (Xiang y col., 2003), cinc (Akhtar y col., 2012) o titanio (Zhang y col., 2010) (Fig. 1).



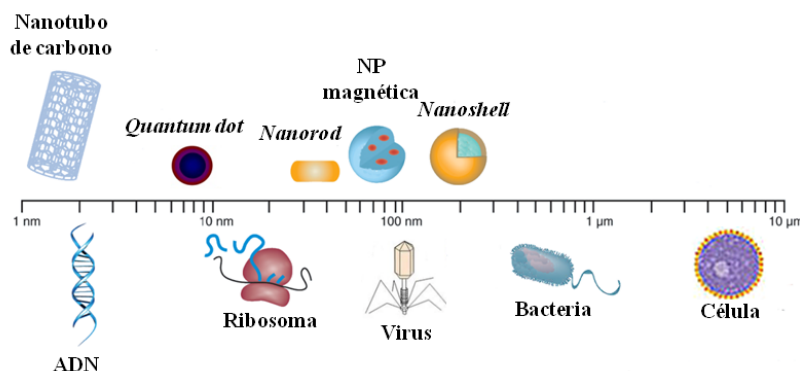
**Figura 1.** Colección de imágenes de diferentes materiales en escala nanométrica, o nanoestructurados, con aplicación en biomedicina, obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión (color añadido). A) Nanocables de plata. B) NPs de oro. C) *Nanoshells*  $\text{SiO}_2\text{@Au}$ . D) *Nanorods* de oro. E) NPs de sílice densa. F) NPs de oro sobre soporte inorgánico. G) NPs de sílice mesoporosa. H) Micro partículas de ácido poliláctico-co-glicólico. I) *Nanoshells*  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ . J) NPs de ZnO. K) Nanotubos de Ti. L) NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Publicado en: Arruebo y col., 2011.

Debido al enorme desarrollo de la nanotecnología, en la última década han emergido una gran variedad de nanoestructuras inorgánicas que poseen propiedades adecuadas para un amplio rango de aplicaciones biológicas y biomédicas. Las principales nanoestructuras biológicamente relevantes son: *quantum dots* (Rosenthal y col., 2011), NPs magnéticas (Gioroudi y col., 2010; Xie y col., 2009; Martín-Saavedra y col., 2010), liposomas y dendrímeros (Huang y col., 2007; Lee y col., 2005), nanoestructuras basadas en carbono (Shi Kam y col., 2005; Bianco y col., 2005; Miyako y col., 2012), NPs de sílice mesoporosa (Xia y col., 2009; Popat y col., 2011; Rosenholm y col., 2009) y NPs metálicas (Huang y col., 2007).

En los últimos años se han explorado las aplicaciones biomédicas de multitud de materiales de tamaño nanométrico, debido a que en virtud de sus reducidas dimensiones

pueden presentar nuevas propiedades y funciones carentes en sus homólogos en bloque (Gao y col., 2009). La reducción del tamaño de grano de un material por debajo de ciertos límites generalmente resulta en la modificación de sus propiedades químicas y/o físicas, alterando las características estructurales, termodinámicas, electrónicas, electromagnéticas o espectroscópicas de los materiales, lo que les confiere un gran atractivo para una amplia gama de aplicaciones tecnológicas (Abu-Salah y col., 2010). La adquisición de nuevas propiedades en NPs con un tamaño apropiado, y la posibilidad de variar su química superficial para facilitar su funcionalización e integración con una gran cantidad de biomoléculas, ha motivado el desarrollo de este tipo de nanoestructuras para su aplicación como agentes terapéuticos (transporte de fármacos y ácidos nucleicos), agentes diagnósticos (agentes de contraste en aplicaciones de imagen basada en resonancia magnética y biosensores moleculares) y agentes térmicos (p. ej., hipertermia magnética o hipertermia óptica en el infrarrojo cercano) (Jain y col., 2007; Katz y Willner, 2004).

Las células y los orgánulos que las constituyen se encuentran en la escala micrométrica y submicrométrica, mientras que las biomoléculas presentan dimensiones nanométricas (Fig. 2). De este modo, las NPs cuyo tamaño oscila desde unos pocos a cientos de nanómetros se convierten en herramientas ideales para su incorporación en sistemas biológicos (Eusteis y col., 2005).



**Figura 2.** Escala relativa de nanomateriales sintéticos en comparación con biomoléculas de origen natural, orgánulos y células.

Cuando se exploran las aplicaciones biomédicas de los nanomateriales, es necesario comprender el impacto de su presencia en el entorno tisular y celular. Determinadas aplicaciones de materiales nanoestructurados en biomedicina implican, obligatoriamente, su acceso al interior celular. La entrada de nanomateriales en la célula

conlleva el paso a través de la membrana celular mediante diferentes procesos, incluyendo:

- Microinyección directa de una dispersión de nanomateriales, procedimiento aplicable a un número limitado de células.
- Electroporación, a través de la creación de un campo eléctrico que altera la permeabilidad de la membrana plasmática permitiendo la entrada de las NPs en las células.
- Internalización no específica vía endocitosis, mediante la cual los nanomateriales a menudo quedan atrapados en compartimentos de la vía endocítica.
- Internalización específica basada en la funcionalización de la superficie de los nanomateriales con moléculas biológicas que interactúan con receptores de la membrana plasmática.

Los nanomateriales, además de ser compatibles con los sistemas biológicos, deben presentar una buena solubilidad en agua, para lo que se recurre al uso de modificaciones superficiales. Aunque hay varias estrategias para modificar la superficie de los nanomateriales, se deben cumplir algunos requisitos básicos como evitar la aglomeración a largo plazo cuando han de ser almacenados, preservar su funcionalidad y garantizar su biocompatibilidad (Gao y col., 2009).

Muchas de las aplicaciones biomédicas de la nanobiotecnología están en desarrollo o en fase preclínica mientras que otras más avanzadas se enfrentan a los obstáculos habituales para la obtención de la aprobación por parte de las autoridades sanitarias, como ocurre en el caso de otros medicamentos y tecnologías innovadoras. A juzgar por el progreso y el creciente interés en este área de conocimiento durante la pasada década, se prevé que los avances más relevantes se produzcan durante la presente (Jain, 2008).

### **3. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS NPs**

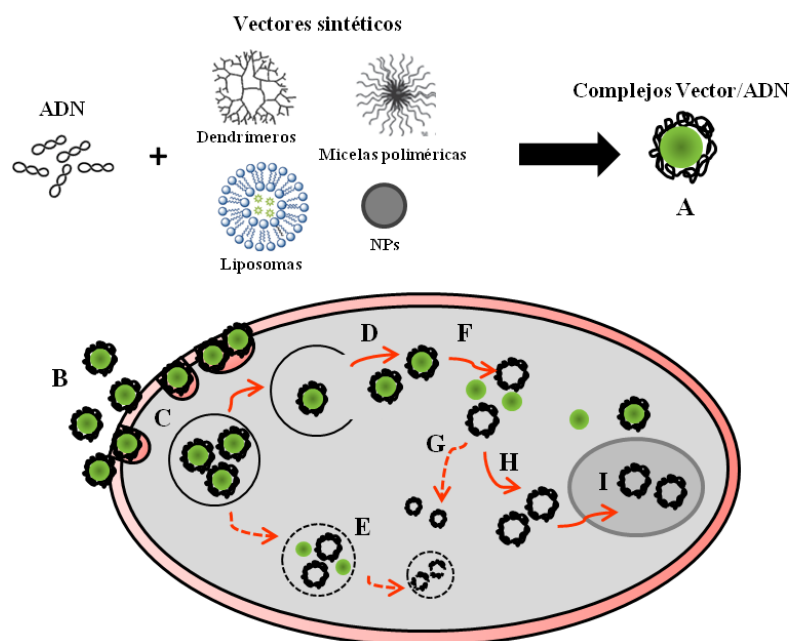
#### **3.1 Transferencia génica**

La transferencia génica tiene como objetivo terapéutico el tratamiento de enfermedades mediante la introducción de ácidos nucleicos en células o tejidos diana con el fin de restaurar su funcionalidad (Corsi y col., 2003). El material genético terapéutico se transfiere a las células utilizando vectores que, tradicionalmente, han sido clasificados como virales y no virales, siendo la mayoría de estos últimos sistemas

sintéticos. Debido a sus componentes altamente evolucionados y especializados, los sistemas virales son con diferencia los vectores más efectivos en la transferencia de ácidos nucleicos pudiendo proporcionar rendimientos de infectividad superiores al 90%. De hecho, alrededor del 70% de los ensayos clínicos basados en protocolos de terapia génica utilizan vectores virales para la transferencia de ácidos nucleicos (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>). Sin embargo, estos vectores presentan algunas limitaciones que incluyen escasa capacidad de carga de material genético, problemas de producción y almacenaje, alto coste de fabricación, toxicidad e inmunogenicidad. Estos factores obstaculizan el desarrollo de estrategias terapéuticas en laboratorios de investigación básica y su potencial translación a la clínica. Por estas razones, los vectores no virales son herramientas cuyo desarrollo presenta gran interés. Los vectores sintéticos con base nanotecnológica deben operar eficientemente a tres niveles: condensación de ácidos nucleicos y conformación de complejos transfectantes, internalización celular y translocación del material genético al núcleo. La interacción electrostática entre ácidos nucleicos, cargados negativamente, y agentes catiónicos es el procedimiento más habitual para conseguir la condensación y conjugación del material genético a vectores de transferencia sintéticos. Estos complejos son internalizados por las células vía endocitosis o a través de su acoplamiento a receptores de membrana. La vía de internalización va a determinar el tráfico intracelular y la posterior liberación de los ácidos nucleicos, así como su vida media en el interior celular. La endocitosis es un proceso que consta de múltiples pasos que incluyen la unión a la membrana plasmática, internalización, formación de endosomas que engloban el material internalizado, fusión con lisosomas y lisis. En el interior de endosomas y lisosomas, el pH es extremadamente bajo, y por lo general, las enzimas endocíticas y lisosómicas degradan los ácidos nucleicos asociados a los complejos. La capacidad de los vectores no virales para proteger los ácidos nucleicos frente a la degradación en el interior de las vesículas endocíticas y lisosomas es un requerimiento clave para determinar su eficiencia como agentes de transferencia génica (Medina-Kauwe y col., 2005; Schaffer y col., 2000). El efecto conocido como “esponja de protones” (del inglés, *proton sponge*), es una de las estrategias más frecuentemente explotadas en el diseño de vectores no virales que evitan la degradación endosomal. A pH fisiológico, las aminas de ciertos polímeros catiónicos (p. ej., polietilenimina (PEI), poliamidas, etc.) se encuentran sólo parcialmente protonadas. En el interior de los endosomas, en el que el ambiente es ácido, los grupos amino son capaces de captar protones, desencadenando un efecto tamponador del pH.

Al disminuir la acidificación del orgánulo, se activa una ATPasa endosomal que provoca la entrada masiva de protones, acompañado de un flujo simultáneo de aniones cloruro (Sonawane y col., 2003). Este incremento neto de la concentración de iones provoca la entrada masiva de agua al interior del endosoma, su hinchamiento y finalmente su ruptura. Tras el escape endosomal y posterior liberación citoplasmática de los complejos transfectantes, los ácidos nucleicos han de dirigirse a sus dianas intracelulares (Shim y Kwon, 2012). En el caso de plásmidos, éstos deben acceder al núcleo donde se inicia la transcripción del transgen. Sin embargo, la entrada a este orgánulo es uno de los mayores obstáculos en la transferencia génica no viral. De hecho, el mecanismo de translocación nuclear del ADN exógeno no ha sido completamente elucidado. La difusión pasiva de macromoléculas en el citoplasma se encuentra limitada por la existencia de una compleja red de microtúbulos, proteínas y orgánulos subcelulares. Por ello, se ha postulado que la entrada del material genético al núcleo ocurre durante el desensamblaje de la membrana nuclear en la mitosis (Del Pozo-Rodríguez y col., 2008). En células con baja tasa de división, las moléculas inferiores a 40 kDa acceden al interior del núcleo mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los poros nucleares, mientras que para moléculas mayores se requiere un mecanismo de transporte activo (van der Aa y col., 2006). En el caso de la transferencia de moléculas de ARN, como ARN pequeño de interferencia o micro ARN, no es necesaria su entrada al núcleo ya que llevan a cabo su función de degradación del ARN mensajero diana en el citoplasma (Zeng y Cullen, 2002).

En resumen, la transferencia de ácidos nucleicos es un proceso constituido por múltiples etapas concatenadas (Fig. 3), cada una de las cuales frecuentemente implica la pérdida de moléculas funcionales. Identificar y superar cada barrera a lo largo del proceso mejora la eficiencia de transferencia génica.



**Figura 3.** Esquema de las vías principales de acceso y tráfico intracelular del ADN. (A) Formación de complejos de ADN con los vectores. (B) Adhesión a la superficie celular. (C) Internalización vía endocitosis. (D) Escape de los endosomas. (E) Degradación en endosomas. (F) Liberación al citoplasma celular. (G) Degradación en el citosol. (H) Translocación nuclear. (I) Expresión génica.

La transferencia de ácidos nucleicos utilizando vectores sintéticos, tales como micelas poliméricas (Osada y col., 2009), dendrímeros (Peng y col., 2010), nanotubos (Son y col., 2007) o NPs (Luo y Saltzman, 2000), ha atraído una creciente atención como consecuencia de su bajo coste de producción, del control de su estabilidad, de la facilidad del escalado de producción y de la falta de inmunogenicidad que en principio caracterizan a estos nanomateriales (Pouton y Seymour, 2001). Se ha observado que determinados tipos de NPs inorgánicas actúan como transportadores eficientes de ácidos nucleicos, preservándolo de ataques enzimáticos, en ensayos de transferencia llevado a cabo tanto *in vitro* como *in vivo*. Ejemplos de esta estrategia incluyen NPs de sílice (Kumar y col., 2004; Na y col., 2012), NPs de óxido de hierro (Xiang y col., 2003), nanotubos de carbono (Bianco A y col., 2005; Raffa y col., 2011) y NPs de oro (Thomas y Klibanov, 2003; Noh y col., 2007; Vega y col., 2010). Además, algunas propiedades asociadas a determinadas características físicas de estos materiales, ópticas, eléctricas o magnéticas, los convierten en candidatos prometedores en nuevas terapias antitumorales como p. ej., hipertermia magnética u óptica. En general, la clave del éxito en la utilización de NPs como vectores no virales depende de diversas variables físicas siendo el tamaño (Kneuer y col., 2000; Prabha y col., 2002) y la carga superficial (Sandhu y col., 2002; Hu y col., 2010) los factores principales que condicionan el

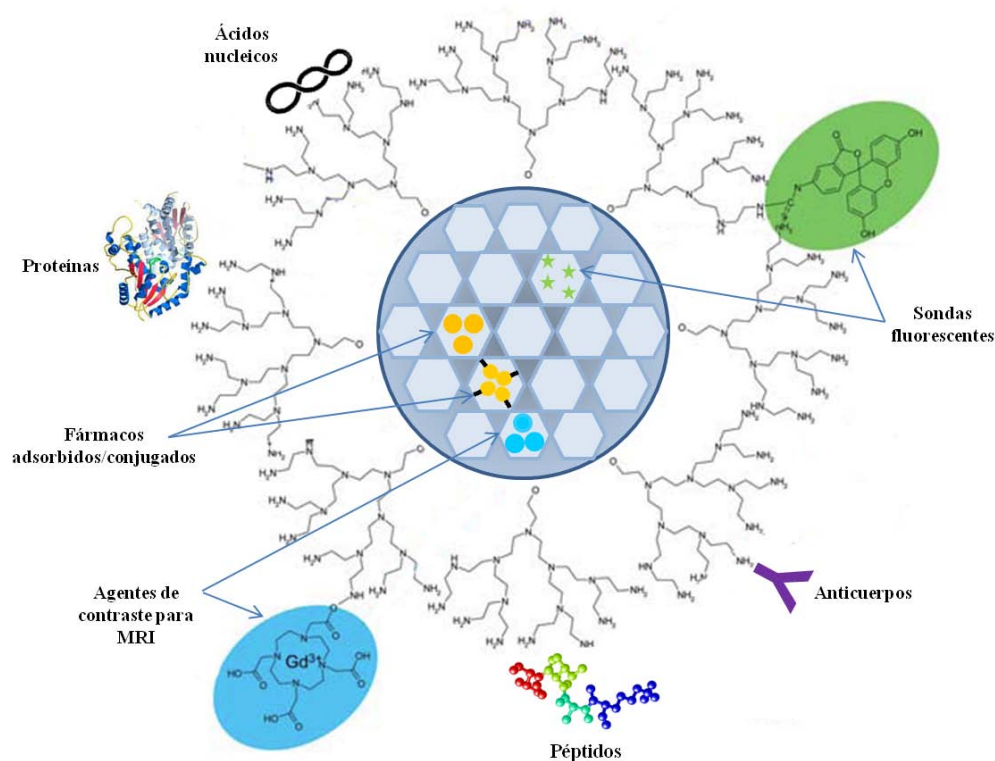
proceso de transferencia génica. Una ventaja adicional del uso de NPs como vectores no virales para la transferencia de genes *in vitro*, proviene de su capacidad de sedimentar sobre las células diana adherentes, concentrando las biomoléculas en su superficie y facilitando la entrada de las mismas (Gemeinhart y col., 2005). Datos en la literatura revelan que la relación en peso de los complejos NPs/ácidos nucleicos (Sandhu y col., 2002; Noh y col., 2007; Niidome y col., 2004; Li y col., 2008) y el período de incubación de los mismos con las células diana (Tan y col., 2007; Del Pozo-Rodríguez y col., 2008; Zhou y col., 2008) también juegan un papel importante en el éxito del proceso de transferencia génica. A pesar de los conocimientos adquiridos en los últimos años sobre la relación entre las propiedades de las NPs y su eficiencia como vectores, los estudios experimentales de transfección con estos agentes siguen plagados de incertidumbres. Incluso NPs con similar funcionalización pero pequeñas variaciones en su tamaño o estado de aglomeración resultan en eficiencias de transfección muy diferentes. Esta disparidad se ha relacionado con los diferentes mecanismos que utilizan las NPs para internalizarse, así como con su posterior tráfico intracelular. Ambos parámetros parecen ser clave en la transferencia del material genético.

### **3.1.1 Nanopartículas basadas en sílice mesoporosa**

La sílice se ha empleado en ciencia de los materiales y en ingeniería desde hace décadas. Es un material muy versátil debido al amplio abanico de modificaciones químicas y físicas a las que puede ser sometido. La sílice es también un material relativamente inocuo, llegando a ser utilizado como suplemento dietético debido a su buena biocompatibilidad (Luo y Saltzman, 2006). Desde su descubrimiento a principios de los años 90 por investigadores de la empresa Mobil Oil y por Inagaki y col., (1993) los materiales de sílice mesoporosa se han utilizado en diversas aplicaciones biomédicas para estabilizar enzimas mejorando su estabilidad, fabricación de biosensores, separación de biomoléculas e imagen molecular, entre otras (Popat y col., 2011; Bitar y col., 2012). Los materiales mesoporosos MCM-41 y SBA-15 son los tipos más comúnmente estudiados (Kresge y col., 1992; Zhao y col., 1998). Recientemente, se ha explorado el uso de NPs de sílice en procesos de transferencia génica. En este sentido, las NPs de sílice mesoporosa (MSN, del inglés *Mesoporous Silica Nanoparticles*) presentan ciertas ventajas sobre otras NPs inorgánicas. Además de su capacidad para concentrar ácidos nucleicos en la superficie celular a través del ya mencionado proceso de sedimentación (Gemeinhart y col., 2005), los mesoporos permiten albergar



elementos adicionales (Fig. 4), como fármacos (Torney y col., 2007; Xia y col., 2009), partículas magnéticas (Yiu y col., 2007), y cromóforos (Radu y col., 2004; Yu y col., 2009). Asimismo, los mesoporos ordenados de las MSN proporcionan la posibilidad de liberar de forma controlada o durante largos periodos de tiempo moléculas encapsuladas o adsorbidas a la estructura porosa de la sílice, quedando a su vez protegidas contra la degradación (Park y col., 2008).



**Figura 4.** Posibilidades de carga de las MSN. Moléculas de bajo peso molecular pueden ser cargadas en los mesoporos de las MSN por un mecanismo de adsorción, aunque también se pueden acoplar a través de los grupos funcionales de las paredes de los poros. En el caso de biomoléculas como proteínas (enzimas, anticuerpos) o ácidos nucleicos, éstos pueden ser adsorbidos o fijados a la superficie de la partícula. Asimismo las MSN se pueden emplear como sistemas de imagen mediante el acoplamiento a la superficie de la partícula y/o las paredes de los poros de sondas fluorescentes, agentes de contraste o NPs magnéticas para su detección por resonancia magnética, permitiendo la visualización del proceso de biodistribución o tráfico intracelular.

Las principales ventajas de las MSN respecto a otros tipos de NPs en el transporte y liberación de biomoléculas se resumen así (Slowing y col., 2008):

- Tamaño de partícula escalable, entre 50 y 300 nm, lo que facilita la endocitosis.
- Estructura estable y rígida que aporta mayor resistencia al calor, pH, fuerza mecánica y degradaciones por hidrólisis y ataque enzimático.
- Tamaño de poro variable, con una distribución que puede variar entre 2 y 6 nm.

- Alta superficie específica y volumen de poro, que permite el acoplamiento de grandes cantidades de biomoléculas.
- Dos superficies, la externa y la interna constituida por las paredes de los poros que pueden ser funcionalizadas de forma selectiva.
- Estructura porosa única, hexagonal y bidimensional, con poros cilíndricos que transcurren desde un extremo de la esfera hasta el extremo opuesto y pueden ser empleados como reservorios independientes.

Las NPs de sílice pura, sin modificaciones superficiales, no son capaces de condensar y transferir ácidos nucleicos al interior celular. Sin embargo, la posibilidad de modificar su superficie con grupos catiónicos ha permitido explorar la utilidad de estos nanomateriales en la transferencia génica (Kneuer y col., 2000; Kumar y col., 2004; Radu y col., 2004). Como se ha mencionado, la estructura mesoporosa posibilita su uso como portadores duales, pudiéndose incorporar moléculas de fármacos en el interior de los mesoporos y a la vez, conjugar moléculas de ácidos nucleicos en su superficie (Xia y col., 2009).

En todas las aplicaciones biomédicas previstas para las NPs de sílice, su estado de agregación juega un papel decisivo, afectando no sólo a su biodistribución en el organismo sino a la liberación de biomoléculas y tráfico intracelular. En el caso de las NPs de sílice, la formación de aglomerados entre partículas se produce fundamentalmente por interacciones mediante puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo superficiales (Tolnai y col., 2001). Estas mismas interacciones tienen lugar cuando las partículas se modifican superficialmente con grupos amino terminales (Lu y col., 2007). Cuanto mayor es la fuerza iónica del medio en el que se encuentran suspendidas las partículas, mayor es su grado de aglomeración, debido a que los iones presentes en el medio compensan la carga positiva superficial de las partículas y el comportamiento de la suspensión resulta similar al que presentarían en las cercanías de su punto isoeléctrico. Esta es una de las razones por la que las NPs suspendidas en medios biológicos tienden a aglomerarse. A estas circunstancias se une la posibilidad de la unión inespecífica de otras biomoléculas, como por ejemplo proteínas, que también podrían causar la neutralización de la carga superficial de las NPs (Díaz y col., 2008; Yagüe y col., 2008). Hay tres formas principales de evitar la aglomeración de materiales basados en sílice, que pueden ser utilizadas individualmente o combinadas. La primera es a través del control de la repulsión electrostática, que se puede lograr trabajando a un pH lo suficientemente lejano del punto isoeléctrico. En el caso de los sistemas

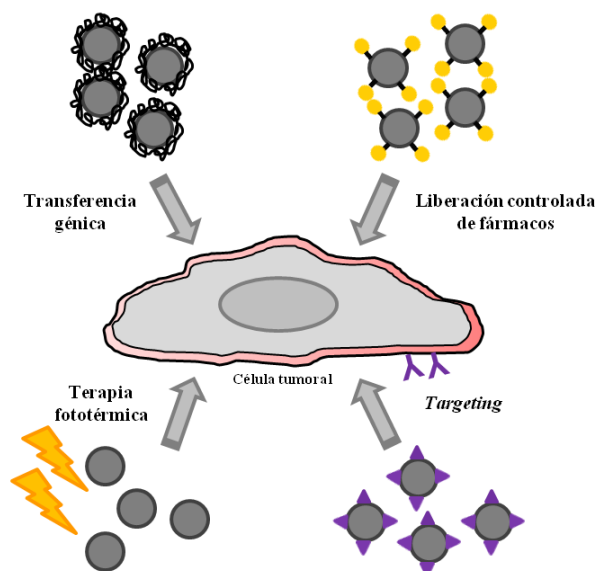
biológicos donde la posibilidad de cambios en el pH es limitado, se recurre a la modificación de la superficie de las MSN con diferentes grupos para lograr un potencial electrocinético suficiente que resulte en repulsión a las condiciones deseadas, en general  $> \pm 30$  mV (Bergman y col., 2008). Alternativamente, las MSN se recubren con polímeros neutros (p. ej., polietilenglicol (PEG), dextrano, etc.) que evitan la aglomeración entre partículas a través de un impedimento estérico. Este efecto, dependiente del peso molecular y de la conformación del polímero, se potencia mediante su asociación con moléculas de agua, incrementando el volumen de las MSN (Kozlowski y Harris, 2001). Finalmente, se ha recurrido al uso de moléculas anfifílicas o surfactantes, que ayudan a la estabilización de los coloides, formando micelas que envuelve a las MSN y favorecen su dispersión (Huo y col., 2006).

Dado que los procesos de aglomeración son difíciles de controlar en medios biológicos, la aglomeración entre partículas se considera un fenómeno físico indeseable. Por ello, para lograr una buena interacción de las NPs de sílice con tejidos y células, es necesario conseguir dispersiones coloidalmente estables.

### 3.1.2 Nanopartículas basadas en oro

El oro metálico, ya sea en bloque o forma particulada, es un material ampliamente utilizado en diferentes campos interdisciplinarios emergentes de la nanotecnología (Daniel y Astruc, 2004). En primer lugar, el carácter no reactivo y relativamente bioinerte del oro hace que este metal sea un buen candidato para aplicaciones biomédicas (Shukla y col., 2005). La baja citotoxicidad de las NPs de oro (GNPs, del inglés *Gold Nanoparticles*) ha sido demostrada en varios trabajos, incluyendo estudios *in vivo* (Lewinski y col., 2008; Paciotti y col., 2004). Desde la década de los 70 se han desarrollado GNPs para su aplicación en biodiagnóstico (Faulk y Taylor, 1971; Elghanian y col., 1997; Nam y col., 2003; Hirsch y col., 2003), terapia fototérmica (Huang y col. 2007; Huff y col. 2007), imagen molecular (le Masne de Chermont y col. 2007; Ratto y col. 2011), transferencia génica (Chen y col. 2006; Huschka y col. 2011), desarrollo de biosensores moleculares (Liu y col. 2008; Chen y col. 2007) y liberación controlada de fármacos (Han G y col., 2007) (Fig. 5). Las GNPs poseen dos propiedades físico-químicas que las hacen especialmente interesantes desde el punto de vista terapéutico. La primera de ellas es que su superficie es fácilmente funcionalizable con anticuerpos u otras moléculas biológicas. La segunda propiedad está basada en las peculiares características ópticas y fototérmicas que provienen de las

oscilaciones resonantes de los electrones libres en presencia de luz, efecto conocido como resonancia localizada de plasmón de superficie (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*) (Cobley y col., 2011). La manipulación de estas propiedades ha permitido optimizar las nanoestructuras de oro con el fin de posibilitar aplicaciones cada vez más específicas, a través del control de su tamaño y forma durante el proceso de síntesis y de la modificación precisa de su superficie.



**Figure 5.** Principales aplicaciones terapéuticas de las GNP.

Como se ha mencionado, uno de los atributos fundamentales que hacen de las nanoestructuras de oro una plataforma prometedora para aplicaciones en biomedicina está relacionado con la química superficial del oro (Niidome y col., 2004), que gracias a su versatilidad de funcionalización permite maximizar la adsorción de biomoléculas (Boisselier y Astruc, 2009). Cabe señalar que las GNP pueden, asimismo, adsorber en su superficie moléculas biológicas de forma no específica. Este hecho es un factor importante al considerar la interacción células/oro en un entorno biológico, donde una gran variedad de proteínas serán adsorbidas por la superficie de las GNP. Dichas proteínas pueden afectar a las propiedades superficiales de las partículas y por tanto a su capacidad de interacción con las células (Alkilany y col., 2009). La unión a moléculas mediante los grupos tioles acoplados a la superficie y la adsorción de polímeros es una técnica muy empleada para funcionalizar la superficie de las GNP (Daniel y Astruc, 2004). Esta funcionalización hace posible el control de la carga superficial de las nanoestructuras, lo cual es relevante ya que, como se ha mencionado, este parámetro puede tener un efecto determinante tanto en la biodistribución como en la captación

celular de las NPs. Además, los grupos catiónicos favorecen la interacción electrostática con el ADN posibilitando la formación de complejos susceptibles de ser internalizados (Xiang y col., 2003; Park y col., 2008; Han y col., 2007). Al igual que lo observado en otras NPs, las GNPs cargadas positivamente presentan una mayor afinidad por las células que las cargadas negativamente, siendo más susceptibles de acceder al citoplasma, aspecto importante a considerar en aquellas aplicaciones que implican la transferencia de biomoléculas al interior celular (Alkilany y col., 2009; Cho y col., 2010).

### **3.2 Hipertermia**

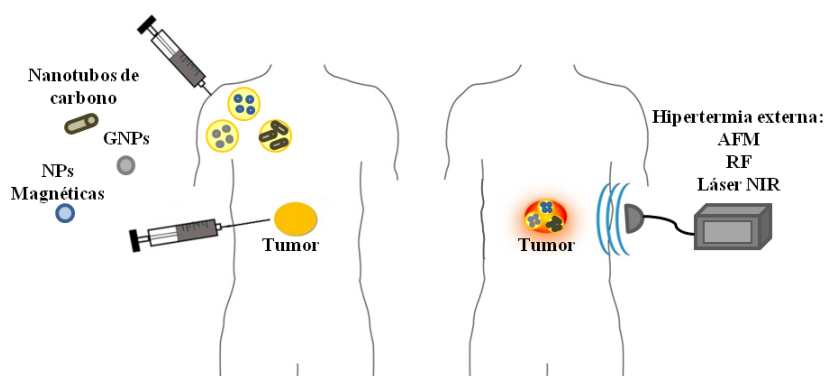
La hipertermia, como terapia contra el cáncer, consiste en elevar la temperatura de un tumor o región tumoral con el fin de inhibir la proliferación de células cancerosas, destruyéndolas o sensibilizándolas a los efectos de los protocolos convencionales de radioterapia y quimioterapia. De hecho, la hipertermia se utiliza actualmente como terapia adyuvante a la radioterapia y/o quimioterapia. Un incremento moderado de temperatura aumenta el flujo sanguíneo en el tumor lo que permite que la quimioterapia ejerza un mayor efecto sobre las células cancerosas. Al deprimir la actividad metabólica de las células, el calor también reduce su demanda de oxígeno, lo que aumenta el nivel del mismo en el tumor, convirtiendo a la hipertermia en uno de los más potentes radiosensibilizadores existentes (Griffin y col., 2010). Cuando se utilizan altas temperaturas, generalmente por encima de 43°C, se induce una desnaturalización global de proteínas que causan un daño irreparable y desencadena mecanismos de muerte celular (Cherukuri y col., 2011; Krishnan y col., 2010). La hipertermia se puede administrar de tres maneras diferentes: cuerpo entero y de forma regional y local (Wust y col., 2002; van der Zee, 2002). Los tratamientos de cuerpo entero implican el calentamiento de todo el cuerpo a temperaturas de alrededor de 39-41°C para tratar cánceres metastásicos. Estos tratamientos se encuentran en fase experimental y emplean incubadores de aire caliente o mantas de agua caliente para administrar el tratamiento al paciente sedado, de forma homogénea. La terapia regional es empleada para calentar áreas grandes como un órgano completo, una cavidad o una extremidad. Se basan en la perfusión de los tejidos diana con sangre del paciente o con una solución de fármaco anticancerígeno calentados externamente, o bien en el empleo de actuadores externos que focalizan fuentes energéticas y elevan la temperatura de órganos profundos. Por último, los tratamientos de hipertermia local calientan una pequeña área del cuerpo,

como un tumor, para destruir las células cancerosas sin dañar al tejido sano que lo rodea. Las fuentes energéticas disponibles para aumentar la temperatura regional o localmente en un tejido biológico incluyen: radiación láser, ondas de radiofrecuencia (RF) o acústicas (ultrasonidos), microondas o campos electromagnéticos. La ventaja más importante de las terapias térmicas es su carácter mínimamente invasivo. Varios ensayos clínicos han demostrado que la aplicación de hipertermia es beneficiosa en el tratamiento de diversos tipos de tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, melanoma, sarcoma y cáncer de cuello uterino avanzado. Los resultados demuestran una mejor supervivencia global, en comparación con pacientes que sólo reciben radioterapia o quimioterapia (Hurwitz, 2010; Moros y col., 2010; Issels y col., 2010). Es previsible que el uso de protocolos de hipertermia aumente de forma significativa a medida que se desarrollan nuevas tecnologías que garanticen la administración de una dosis térmica óptima permitiendo un mejor control sobre el avance del tumor.

Los recientes avances en materiales nanoparticulados han contribuido al diseño de métodos no invasivos para el calentamiento terapéutico de las células tumorales. Diferentes tipos de NPs son capaces de interaccionar con energías como la luz en la región del infrarrojo cercano (NIR, del inglés *Near Infrared Region*), pulsos de RF o campos electromagnéticos, resultando en el calentamiento del nanomaterial y la disipación de energía térmica hacia el entorno (Fig. 6), lo que posibilita su aplicación en protocolos de hipertermia (Manthe y col., 2010). Las NPs de tamaño comprendido entre 60 y 400 nm pueden alcanzar la región tumoral simplemente mediante transporte pasivo, a través del efecto conocido como permeabilidad y retención aumentada (EPR, del inglés *Enhanced Permeation and Retention effect*), facilitado por las características diferenciales del entorno tumoral, donde el tejido vascular se encuentra alterado (Hirsch y col., 2006). Este efecto se ha atribuido a la elevada proliferación de vasos sanguíneos en el interior de los tumores. Cuando la masa tumoral alcanza un tamaño de 2-3 mm, comienza la inducción del proceso de angiogénesis para satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes del tumor en crecimiento. La neovascularización resultante difiere ampliamente de la de un tejido sano, los vasos sanguíneos son irregulares, dilatados, con poros o defectuosos, lo que facilita una mayor permeabilidad a los componentes del plasma sanguíneo (Hobbs y col., 1998). Esto explica la mayor acumulación de NPs en la masa tumoral, en comparación con un tejido sano. Por otro lado, las NPs también pueden adsorber en su superficie moléculas biológicas que proporcionan una funcionalidad específica al material permitiendo su acumulación selectiva en las

proximidades del tumor mediante un transporte activo (Ghosh y col., 2008). En este sentido, las estrategias más avanzadas para la destrucción de tumores se basan en acoplar a la superficie de NPs anticuerpos que reconozcan específicamente receptores como el receptor del factor de crecimiento epitelial humano (HER2) en adenocarcinoma de mama, meduloblastoma y glioma (Bernardi y col., 2008; Lowery y col., 2006; Zhang y col., 2011), el receptor de efrinas A2 (EphA2) en cáncer de próstata (Gobin y col., 2008) y de ovario (Tandon y col., 2011) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en cáncer de cabeza y cuello, en carcinoma epidérmico y de pulmón (Melancon y col., 2008; Melancon y col., 2011; Yokoyama y col., 2011). Combinando estas dos cualidades, producción de calor y acumulación en el área tumoral, las NPs ofrecen una nueva posibilidad terapéutica. Por ejemplo, las NPs magnéticas son capaces de generar hipertermia tras la aplicación de un campo magnético alterno externo (AMF, del inglés *Alternating Magnetic Field*) mediante el fenómeno físico de histéresis magnética. La disipación de la energía magnética de las NPs provoca un incremento de temperatura del medio en el que se encuentran por encima de los 43°C, induciendo muerte celular. Los efectos antineoplásicos observados tras el tratamiento con NPs magnéticas y AFM en modelos animales de glioma y cáncer de próstata (Silva y col., 2011; Basel y col., 2012) ha dado lugar al paso de esta tecnología a ensayos clínicos de fase I y II para el tratamiento de carcinoma de próstata y glioblastoma multiforme. Se ha demostrado que la hipertermia magnética en combinación con dosis reducidas de radioterapia conduce a una mayor supervivencia en comparación con las terapias anticancerígenas convencionales (Johannsen y col., 2010; Maier-Hauff y col., 2011). Sin embargo, el procedimiento de hipertermia magnética presenta algunos inconvenientes, incluyendo el malestar del paciente a campos magnéticos de alta intensidad así como la distribución irregular del calor en el tumor incluso tras la inyección intratumoral directa del nanomaterial. La capacidad de algunas NPs (NIR-NPs) para absorber luz en la región NIR del espectro conocida como ventana del agua (700-1200 nm), en la que los tejidos biológicos son incapaces de absorber energía (Simpson y col., 1998), proporciona una excelente oportunidad para desarrollar terapias hipertérmicas localizadas. En particular, algunos nanomateriales basados en oro o en carbono poseen una elevada capacidad de absorción en el rango de longitudes de onda que incluye la región de la ventana del agua, convirtiendo eficazmente la energía absorbida en energía fototérmica (Pissuwan y col., 2006; Gannon y col., 2007). Si un tejido se infiltra con una concentración adecuada de NIR-NPs, la aplicación de un láser

convertirá rápidamente la energía lumínica en energía térmica, aumentando la temperatura en el tejido que alberga las NPs sin afectar a aquellos en los que estos materiales no están presentes (Gupta y col., 2012; Shi Kam y col., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que las GNPs y los nanotubos de carbono de pared única (SWNT, del inglés *Single-Walled Carbon Nanotubes*) muestran un incremento de temperatura lineal tras ser sometidas a RF (Cherukuri y col., 2010; Gannon y col., 2007; Glazer y col., 2010). En concreto, los SWNT y las GNPs son capaces de producir citotoxicidad mediada por un incremento de temperatura en líneas celulares y modelos animales de hepatocarcinoma tras ser sometidos a RF (Raoof y Curley, 2011).



**Figura 6.** Metodologías desarrolladas para la generación de hipertermia mediada por NPs. Suspensiones de diferentes tipos de NPs se administran por vía intravenosa o directamente en la masa tumoral. Las NPs se acumulan en los tumores actuando como focos de calor tras la administración de diferentes tipos de radiación.

La ventaja principal de la hipertermia mediada por NPs, en relación a otras metodologías que no requieren de elementos exógenos para incrementar la temperatura del tumor (p. ej., ultrasonidos o microondas), reside en que estos vectores pueden albergar fármacos o agentes biológicos con el fin de aumentar el control sobre la progresión tumoral. En este sentido la actividad sinérgica establecida por la combinación de la fototerapia con la terapia génica puede ser útil para lograr un control espacial y temporal de la expresión de transgenes terapéuticos en el órgano necesitado de terapia, estrategia que se revela eficaz para evitar efectos secundarios en tejidos donde la terapia génica pudiera resultar tóxica. Así, la regulación de la duración, localización y nivel de expresión del transgen pueden ser controlados de manera externa mediante el empleo de promotores inducibles por calor (Robson y Hirst, 2003; Locke y col., 1995). Una respuesta común de todos los organismos a temperaturas más elevadas que las fisiológicas es la inducción de un grupo de proteínas altamente conservadas, denominadas proteínas de choque térmico (HSP, del inglés *Heat Shock Protein*). Las



HSP son una familia de proteínas que están presentes en todas las células eucariotas examinadas hasta la fecha y se clasifican según su peso molecular (p. ej., HSP90, HSP70, HSP60 por su peso de 90, 70 y 60 kDa, respectivamente). La mayoría de estas proteínas están normalmente presentes a temperaturas fisiológicas, desempeñando importantes funciones para la homeostasis celular. Tras la exposición a un estrés, como una elevación de temperatura o ciertos agentes químicos, sus niveles se incrementan transitoriamente como mecanismo de respuesta y protección frente a estas condiciones adversas. En el ámbito intracelular, las HSP actúan como chaperonas, facilitando el ensamblaje correcto de las proteínas, así como la translocación de oligómeros y la eliminación de proteínas dañadas de forma irreversible (Morimoto, 1998). En todos los promotores de los genes que codifican las HSP se encuentran los denominados elementos de choque térmico (HSE, del inglés *Heat Shock Element*), muy conservados en todos los eucariotas. Los HSE son los elementos que confieren la capacidad de regulación térmica a los promotores *HSP*, y están compuestos de tres o más repeticiones de la secuencia pentamérica 5'-nGAAn-3'. Estas secuencias son reconocidas por los factores de transcripción de choque térmico (HSF, del inglés *Heat Shock Factor*), que se unen a los mismos, funcionando como activadores transcripcionales. Las células de mamíferos expresan al menos tres tipos diferentes de HSFs, siendo HSF1 el mejor estudiado. La inducción térmica de la expresión de los genes *HSP* no se observa en ausencia de este factor (Christians y Benjamin, 2006). HSF1 se encuentra como monómero inactivo en el citoplasma de células en condiciones fisiológicas pero ante un estrés, el factor HSF1 trimeriza, se transloca al núcleo y es capaz de unirse a los HSEs, induciendo la expresión de las HSPs (Vilaboa y Voellmy, 2006). El promotor del gen *HSP70B* es uno de los promotores más altamente inducibles por calor, caracterizado por tener una actividad basal muy baja que aumenta miles de veces en células sometidas a un tratamiento térmico subletal. Por otro lado, la activación del promotor *HSP70B* es función de la duración de la exposición y de la temperatura alcanzada. Estas características lo convierten en una herramienta muy poderosa para regular la expresión inducible de transgenes con actividad terapéutica. En consecuencia, desde la década de los 90 se ha discutido la posibilidad de utilizar este promotor para el control localizado de la expresión de transgenes. En este sentido, numerosos investigadores han conseguido modular la expresión de diferentes transgenes utilizando el promotor *HSP70B* tras su activación mediante estímulos térmicos, incluidos los mediados por

NPs (Deckers y col., 2008; Vilaboa y col., 2005; Deguchi y col., 2009; Miyako y col., 2012).

### 3.2.1 Nanopartículas basadas en oro

Como se ha mencionado, las nanoestructuras de oro capaces de absorber luz de la región NIR conocida como ventana del agua (700-1200 nm) han despertado gran interés por su potencial terapéutico. La SPR típica para nanoesferas de oro se localiza aproximadamente a una longitud de onda de 520 nm, pero puede ser desplazada a la región NIR. El tamaño, forma, estructura y composición son factores que modifican la frecuencia de resonancia de las NPs metálicas (Fernández-Cabada y col., 2012; Cobley y col., 2011). El control de la morfología y composición de las nanoestructuras de oro es un recurso poderoso para controlar su respuesta óptica, ya que pequeños cambios en la relación de aspecto de las partículas tienen un gran impacto sobre este parámetro (Kelly y col., 2003). En general, se utilizan dos estrategias para modificar la SPR en la región NIR mediante el control de la morfología en GNPs macizas (Yang y Cui, 2008) y mediante el ajuste del espesor de las paredes en nanoestructuras de oro huecas o de tipo núcleo-cubierta, también denominados *nanoshells* (NS) (Hirsch y col., 2006).

La idea de la aplicación de las GNPs en fotoablación térmica de tumores data de los años 50 (Aden y Kerker, 1951), no habiendo sido ensayadas *in vivo* hasta los años 90 (Welch y van Gemert, 1995). Trabajos recientes empleando estos nanomateriales describen reducciones en el tamaño tumoral superiores al 90% en diversos modelos animales (Lu y col., 2011; Gobin y col., 2007; Gupta y col., 2012).

#### 3.2.1.1 Nanoshells de oro

La modificación de la longitud máxima de absorción en la región NIR se puede lograr empleando nanomateriales tipo *nanoshells* (NS), formados por un núcleo de un material dieléctrico y una carcasa metálica. El material del núcleo más utilizado en este tipo de estructuras es la sílice densa recubierta de una carcasa de oro. Actualmente existen diferentes publicaciones en las que se detalla la síntesis y caracterización de diferentes tipos de NS para diagnóstico y terapia que combinan propiedades ópticas y magnéticas. Estos materiales consisten básicamente en una matriz de sílice con núcleo magnético (Melancon y col., 2011; Khosroshahi y Ghazanfari 2012; Ji y col., 2007) o NPs de magnetita en su superficie (Kim J y col., 2006; Stoeva y col., 2005) y una cubierta de oro. Las propiedades espectrales de estas estructuras se pueden controlar

mediante la variación de las dimensiones relativas del núcleo y la cubierta (Pissuwan y col., 2006). Se ha demostrado que las NS de núcleo de sílice densa y cubierta de oro, tras irradiación con un láser NIR, son capaces de generar hipertermias letales tanto en líneas celulares (Cheng y col., 2009; Carpin y col., 2011) como en modelos animales tumorales (Gobin y col., 2007; Gupta y col., 2012). En la actualidad se está llevando a cabo un ensayo clínico en pacientes con tumores refractarios o recurrentes de cabeza y cuello (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00848042>) para evaluar la eficiencia de las NS en la supresión de estos tumores. Merece la pena señalar la reciente generación de NS con núcleo de sílice porosa y su aplicación para la liberación controlada de moléculas de interés tras la irradiación NIR (Yagüe y col., 2010).

### **3.2.1.2 Nanopartículas de oro huecas**

Las nanoesferas de oro huecas (HGNNs, del inglés *Hollow Gold Nanoparticles*) se componen de una delgada cubierta de oro con un interior hueco y se caracterizan por la presencia de un máximo de absorción intenso en la región NIR del espectro (Schwartzberg y col., 2006). La relación entre el diámetro y el espesor de la cubierta metálica, así como su uniformidad, determinan la posición y la anchura del máximo de absorción de radiación electromagnética en la región NIR, respectivamente (Preciado-Flores y col., 2011). Las nanoestructuras huecas ofrecen varias ventajas sobre las NPs de oro macizas, como una mayor eficiencia de absorción de luz en la región NIR por unidad de masa, lo que implica una reducción de la cantidad y coste del material empleado para su síntesis. Una ventaja adicional del uso de estas NPs en aplicaciones biológicas proviene de la posibilidad de almacenaje de biomoléculas en su interior (Liang y col., 2005; Kumar y col., 2005; You y col., 2010). Al igual que en el caso de las NS, se ha demostrado que las HGNNs en combinación con un láser NIR pueden actuar como agentes fototérmicos eficientes tanto en líneas celulares (Cheng y col., 2009) como en modelos animales (Lu y col., 2011; Gupta y col., 2012).

### **3.2.1.3 Nanorods de oro**

Los nanobastones de oro (NRs, del inglés *nanorods*) poseen forma alargada y se caracterizan por presentar propiedades ópticas únicas dependientes de sus dimensiones (Yang y Cui, 2008). Como consecuencia de su evolución de esferas a bastones, su resonancia plasmónica presenta dos bandas de absorción en el espectro electromagnético, perpendiculares entre sí. La primera se conoce como banda

transversal de plasmones, se debe a la absorción y dispersión de la luz a lo largo de la anchura del NR y se encuentra en la región visible, a una longitud de onda de unos 520 nm. La otra banda se conoce como banda longitudinal de plasmones, se debe a la absorción y dispersión relativa de la luz a lo largo del eje longitudinal del NR y se encuentra en la región NIR del espectro electromagnético. La morfología de los NRs puede afectar notablemente a su espectro de absorción al aumentar la relación de aspecto (longitud/anchura), pudiéndose desplazar la banda de absorción longitudinal dentro de la región NIR del espectro (Link y El-Sayed, 1999). En comparación con otros tipos de NIR-NPs, los NRs poseen una mayor eficiencia de absorción de luz en su banda longitudinal de plasmones por unidad de volumen (Yang y Cui 2008; Huff y col., 2007). Los NRs presentan además anchuras de banda significativamente más estrechas que las NPs esféricas dentro de la misma frecuencia de resonancia mostrándose más eficientes en la conversión de la energía absorbida en calor, siendo así capaces de producir altos gradientes térmicos en medios con baja conductividad térmica (Chou y col., 2005). Datos existentes en la bibliografía indican que los NRs pueden actuar como agentes fototérmicos eficientes tanto *in vitro* como *in vivo* en presencia de un láser NIR (Li y col., 2010; Fernández-Cabada y col., 2012; Puvanakrishnan y col., 2012). Sin embargo, los NRs sintetizados empleando como surfactante bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr), que actúa como estabilizador, podrían resultar citotóxicos debido a la capacidad de degradación de membranas biológicas y péptidos por parte de este agente, observado tanto *in vitro* como *in vivo* (von Maltzahn y col., 2009; Lee y col., 2009). La posibilidad de recubrir la superficie de los NRs con polímeros neutros o surfactantes iónicos, además de mejorar notablemente su biocompatibilidad aumenta su estabilidad coloidal, factor determinante en aplicaciones biomédicas (Rayavarapu y col., 2010).

## ***OBJETIVOS***



En base a los antecedentes expuestos, los objetivos propuestos para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Evaluar el efecto de la funcionalización superficial de NPs de sílice mesoporosa (MSN), mediante unión covalente a aminas primarias o cuaternarias y/o recubrimiento con aminas cíclicas y polímeros catiónicos, sobre la eficiencia de transfección en cultivos de células humanas.
2. Estudiar la influencia del tamaño de NPs basadas en oro y funcionalizadas con polietilenimina (GNPs-PEI) sobre la eficiencia de transfección en cultivos de células humanas, y su relación con los mecanismos de internalización celular.
3. Analizar la capacidad de NPs plasmónicas basadas en oro (NIR-NPs) para generar hipertermia óptica y mediar expresión transgénica dependiente del incremento de temperatura en cultivos de células humanas.





## ***MATERIAL Y MÉTODOS***



## 1. NANOPARTÍCULAS ENSAYADAS

Las NPs utilizadas en el presente trabajo han sido generadas y/o caracterizadas por el Grupo de Superficies y Partículas Nanoestructuradas del Instituto de Nanociencia de Aragón (NFP-INA) en Zaragoza (Tabla 1).

Tipos de NPs	Tamaño	Funcionalización	Recubrimiento
MSN: SiO <sub>2</sub> (Zeng y col., 2005)	110-150 nm	-NH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -NH <sub>4</sub>	PDDA PEI
GNPs < 100 nm: Au (Sigma Aldrich)	< 100 nm		PEI
GNPs < 10 nm: Au (Kim y col., 2008)	< 10 nm		PEI
NS: <i>Nanoshells</i> SiO <sub>2</sub> /Au (Oldenburg y col., 1998)	160-170 nm		
HGNPs: Huecas Au (Preciado-Flores y col., 2011)	20-50 nm		
NRs: <i>Nanorods</i> Au (Ni y col., 2008)	50x12 nm		mPEG

**Tabla 1.** Listado de las NPs empleadas en el desarrollo de este trabajo.

### 1.1 MSN

Como punto de partida para la síntesis de MSN de MCM-41, se siguió el procedimiento descrito por Zeng y col., (2005) que describe la síntesis de dichas partículas por reacción de un gel precursor (1 TEOS: 0,035 CTABr: 0,175 NaOH: 692,5 H<sub>2</sub>O) bajo agitación a 80°C durante 3 h. El ortosilicato de tetraetilo (TEOS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) se utiliza como fuente de silicio y el CTABr (Sigma-Aldrich) como agente director de la estructura (ADE). El catalizador de la reacción es el hidróxido de sodio (NaOH) (Panreac, Barcelona, España). Una vez obtenidas las MSN, el ADE se elimina para dejar libre la estructura mesoporosa mediante extracción con una mezcla de HCl al 10% en etanol absoluto durante al menos 12 h a 80°C. Después el producto se lava con etanol, empleando al menos 3 ciclos de centrifugación. Se evitó la calcinación como método para eliminar el surfactante, ya que este procedimiento da lugar a la aglomeración inter partículas y agregación irreversible. La extracción completa del surfactante en las MSN se corroboró mediante espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, del inglés *Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy*) con el objetivo de excluir cualquier efecto citotóxico asociado a un posible remanente de CTABr en el material resultante. De esta

manera, la carga eléctrica en las MSN se atribuye únicamente a su funcionalización superficial. Posteriormente, la superficie de las MSN sintetizadas se modificó con distintos grupos funcionales y/o con distintos recubrimientos poliméricos con el objetivo de invertir la carga negativa de la superficie del material, proporcionada inicialmente por grupos hidroxilo y facilitar su estabilización hidrodinámica. Para ello se ha empleado la unión covalente de grupos amino primarios (MSN-NH<sub>2</sub>), siguiendo el protocolo experimental aplicado a zeolitas (aluminosilicatos) descrito por Kulak y col., (2000) y de grupos amonio (MSN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de acuerdo al método descrito previamente por Balas y col., (2008). Otra alternativa para la obtención de MSN cuyas superficies estén cargadas positivamente a pH fisiológico es la introducción de recubrimientos poliméricos. Una de las vías utilizadas ha sido el recubrimiento mediante cloruro de poli(dialildimetilamonio) (PDDA, Sigma-Aldrich), portador de grupos amino cuaternarios, para generar las MSN-NH<sub>2</sub>-PDDA. Esta especie de MSN se obtuvo a partir de la incubación de MSN-NH<sub>2</sub> con una solución de polímero catiónico PDDA disperso en agua a una concentración de 4 mg/ml. Otro polímero utilizado para el recubrimiento de las NPs de sílice fue PEI (Sigma-Aldrich) que posee grupos aminos primarios, secundarios y terciarios en una proporción de 1: 1,2: 0,76, respectivamente, para generar las MSN-PEI. Para llevar a cabo la síntesis de las MSN-PEI, se añadió 1 ml de una disolución de PEI 0,5x10<sup>-3</sup> M a 20 ml de una suspensión de MSN al 1% en peso, agitando a temperatura ambiente. En ambos casos, las MSN resultantes se purificaron por diálisis para eliminar el exceso de PDDA y PEI respectivamente.

## 1.2 GNPs

En el desarrollo del presente trabajo se han utilizado cuatro tipos de GNPs que difieren en su funcionalización superficial y en su tamaño (Tabla 1).

La síntesis y la estabilización de las NPs denominadas GNPs < 10 nm, se llevó a cabo utilizando el método de reducción de ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>, Strem Chemicals, Newburyport, MA, EE.UU.) mediante el empleo de citrato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>) de acuerdo al método descrito por Kim y col., (2008) introduciendo algunas modificaciones. En el caso de las GNPs < 10 nm funcionalizadas con PEI, GNPs-PEI < 10 nm, el polímero no solo se utiliza como recubrimiento, sino que, además, desempeña un papel como agente reductor en la síntesis de las GNPs a partir de HAuCl<sub>4</sub>. Para ello, a un volumen de 20 ml de una disolución de HAuCl<sub>4</sub> a 0,05 mg/ml se le añadió 1 ml de disolución de PEI 0,5x10<sup>-3</sup> M, agitando vigorosamente. Las GNPs

comerciales de tamaño  $< 100$  nm (Sigma-Aldrich) se modificaron con recubrimiento de PEI. A un volumen de 20 ml de la suspensión de oro nanoparticulado comercial al 1% en peso, se añadió 1 ml de PEI  $0,5 \times 10^{-3}$  M, agitándose a temperatura ambiente.

Tanto en el caso de las GNPs-PEI  $< 10$  nm como de las GNPs-PEI  $< 100$  nm, el exceso de PEI se eliminó mediante diálisis.

### **1.3 NIR-NPs BASADAS EN ORO**

#### **1.3.1 NS**

La preparación de las NS de oro se realizó siguiendo el procedimiento general descrito por Oldenburg y col., (1998). En primer lugar se prepararon NPs de sílice que constituyen el núcleo siguiendo el procedimiento de síntesis de NPs de sílice densa descrito por Stöber y col., (1968). Una vez obtenidas las NPs de sílice densa, su superficie se modificó mediante enlace covalente entre los grupos hidroxilo superficiales y un reactivo con grupos amino terminales, 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES). Para ello se añadieron 50 ml de etanol absoluto y 50  $\mu$ l de APTES al medio de reacción que contenía las NPs, y se dejaron reaccionar durante 2 h en agitación. Transcurrido este tiempo se calentó el recipiente de reacción en un baño a  $60^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo durante 1 h con agitación. Una vez modificadas las partículas, se lavaron con etanol mediante 3 ciclos de centrifugación y dispersión en ultrasonidos. Las NPs de sílice funcionalizadas con grupos amino, constituyen el núcleo de las NS. Por otra parte, se prepararon GNPs siguiendo el método de Duff y Baiker, (1993) que consiste en la reducción de  $\text{HAuCl}_4$  en medio básico y en presencia de cloruro de tetrakis(hidroximetil)fosfonio (THPC) como agente reductor. A un volumen de 45 ml de agua Milli-Q se añaden 0,5 ml de NaOH 1 M y 1 ml de THPC al 1,2% en peso en agua, y se agita durante 5 min. Después se añaden rápidamente 2 ml de  $\text{HAuCl}_4$  al 1% en peso en agua. En estas condiciones se obtienen las GNPs cuyo tamaño oscila entre 1 y 4 nm. A continuación, la superficie de las NPs de sílice se siembra con las GNPs, poniendo en contacto un exceso de éstas con los núcleos de sílice aminada. Para ello se añadieron 10 ml de las GNPs a 1 ml de la suspensión de NPs de sílice funcionalizadas con grupos amino, la mezcla se agitó manualmente y se dejó en reposo durante 2 h a temperatura ambiente protegida de la luz. En estas condiciones se genera un enlace dativo entre el par de electrones libre de los átomos de nitrógeno de los grupos amino terminales y las GNPs (Grabar y col., 1996). El producto se centrifugó a 2000 rpm durante 30 min, al menos 6 veces, hasta conseguir un sobrenadante claro. El pellet de

color rojizo, característico del recubrimiento de los núcleos de sílice con GNPs, se resuspendió en 5 ml de agua. La carcasa de oro se creció poniendo en contacto 200  $\mu$ l de las NPs de sílice recubiertas con NPs de oro con 4 ml de una solución de  $\text{HAuCl}_4$  y carbonato potásico ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ). Posteriormente, se añadieron 10  $\mu$ l de formaldehído y la mezcla se mantuvo en agitación durante 5 min. Cuando la cubierta de oro queda totalmente establecida la solución adquiere un color azul característico. Por último, las NS se separaron mediante centrifugación, se re-dispersaron en agua y se almacenaron para su uso posterior. Todos los productos químicos empleados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor.

### 1.3.2 HGNPs

Las HGNPs se sintetizaron mediante la reacción de reemplazo galvánico de cobalto con oro utilizando poli(vinilpirrolidona) (PVP) como agente estabilizador, siguiendo el protocolo experimental descrito previamente por Schwartzberg y col., (2006) con algunas modificaciones (Preciado-Flores y col., 2011). La síntesis se llevó a cabo utilizando métodos libres de aire para evitar la oxidación prematura de las partículas de cobalto. Se combinaron 100 ml de agua Milli-Q con 100  $\mu$ l de cloruro de cobalto hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,4 M y 400  $\mu$ l de citrato de sodio dihidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,1 M. La solución se desgasificó mediante burbujeo con gas argón durante 40 min sin agitación magnética. A esta solución se añadieron 100  $\mu$ l de una solución de PVP ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$ )<sub>n</sub> (55 kDa) al 1% en peso y 100  $\mu$ l de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) 1 M con agitación magnética. En el transcurso de segundos, el color de la solución viró de rosa pálido a marrón, lo que indicó la formación de las NPs de cobalto. La dispersión de NPs de cobalto se desgasificó mediante burbujeo con gas argón durante 15 min. El cese del burbujeo indicó que la hidrólisis del borohidruro se había completado. Posteriormente, 30 ml de la suspensión de NPs de cobalto se mezclaron en agitación con una solución de  $\text{HAuCl}_4$  a una concentración de  $0,15 \times 10^{-3}$  M, lo que permitió la formación de  $\text{CoCl}_2$  y la reducción del  $\text{Au}^{3+}$ . Esta dispersión se mantuvo en agitación durante otros 30 min a temperatura ambiente para permitir la oxidación completa del cobalto. El cambio de color de la dispersión, de marrón a verde, indica que la formación de las HGNPs se ha completado con éxito. Todos los productos químicos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor.

### 1.3.3 NRs acoplados a metil-polietilenglicol-tiol

Los NRs de oro se sintetizaron siguiendo un protocolo mediado por la formación de semillas en solución acuosa (Ni y col., 2008). La dispersión de semillas se preparó mediante la adición de 0,18 ml de  $\text{HAuCl}_4$  al 1% en peso a 10 ml de una solución de CTABr 0,1 M y posterior agitación. A continuación, 600  $\mu\text{l}$  de una solución fría de  $\text{NaBH}_4$  0,01 M, se mezclaron rápidamente con la dispersión anterior, seguido de una rápida inversión durante 2 min. La dispersión de semillas se mantuvo a temperatura ambiente durante al menos 2 h antes de su uso. Para crecer los NRs, se mezclaron con agitación magnética 125 ml de CTABr 0,2 M, 6,25 ml de  $\text{AgNO}_3$  0,004 M, 125 ml de  $\text{HAuCl}_4$  0,001 M y 1,75 ml de ácido ascórbico 0,079 M en un matraz al baño maría a 28°C. Al añadir el ácido ascórbico, el color de la solución pasa de amarillo a transparente. En ese momento se añaden 300  $\mu\text{l}$  de las semillas preparadas. La reacción se mantiene 20-30 min para alcanzar el tamaño de NRs deseado. A continuación los NRs recubiertos con CTABr se centrifugaron y se resuspendieron en metil-polietilenglicol-tiol (mPEG) de 5 KDa 250  $\mu\text{M}$  (Laysan Bio Inc. Arab, AL, EE.UU.). La mezcla se mantuvo durante 1 h a temperatura ambiente. El exceso de mPEG se eliminó mediante purificación por diálisis (von Maltzahn y col., 2009). Todos los productos químicos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor.

### 1.4 Caracterización de las NPs y los complejos NPs/ADN

Las determinaciones de distribución de tamaño y potencial zeta de las dispersiones de NPs y complejos NPs/ADN en distintos medios, que varían en cuanto a pH, fuerza iónica y presencia o ausencia de proteínas, se obtuvieron mediante espectroscopía de correlación fotónica (PCS, del inglés *Photon Correlation Spectroscopy*) empleando un analizador de tamaño de partícula Brookhaven 90 Plus (Brookhaven Instruments Co, Holtsville, NY, EE.UU.). Para las cuantificaciones de estas medidas se utilizó un software de análisis multimodal y se tuvo en cuenta la viscosidad de los medios de dispersión de las NPs y el índice de refracción de las mismas. La distribución del tamaño de partícula se logra en base a una representación de la intensidad relativa de luz dispersada por NPs de diferentes tamaños (conocida como intensidad de distribución de tamaño). Para llevar a cabo esta determinación, se emplea una función de autocorrelación mediante un algoritmo que separa las diferentes poblaciones de NPs. La resolución en la separación de poblaciones fue de un factor de

cinco o más y la diferencia en las intensidades relativas entre dos poblaciones diferentes fue menor de  $1:10^{-5}$ . Todas las determinaciones de las muestras se realizaron por triplicado.

El estudio morfológico de las diferentes NPs por microscopía electrónica de transmisión (MET) se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio JEOL 2010F (JEOL, Tokio, Japón), que trabaja a 200 kV y tiene una resolución de punto a punto de 0,19 nm. Los aglomerados de NIR-NPs en suspensiones acuosas se observaron mediante microscopía confocal láser de barrido (MCLB). Para ello se prepararon suspensiones de NIR-NPs a 0,01 mg/ml, y 200  $\mu$ l de cada suspensión se montaron sobre un portamuestras con glicerol al 90% en tampón fosfato salino (PBS, pH = 7,4). Debido a su carácter metálico, las NIR-NPs se pudieron visualizar directamente utilizando el modo de reflexión del microscopio confocal, excitando la muestra con la línea láser de 488 nm y recogiendo la emisión de la señal en el rango de 480-500 nm. Como control, las NIR-NPs se visualizaron empleando luz transmitida. Ambos métodos de detección se compararon mediante el análisis de imágenes superpuestas de los mismos campos. El tamaño de los aglomerados de NIR-NPs detectados en medios acuosos se determinó fotografiando cinco campos que contenían un número de aglomerados representativo de la muestra (200 agregados por campo, seleccionados al azar de tres experimentos independientes). Para evitar imprecisiones en la medida, las fotografías se ampliaron y los contornos de las partículas se determinaron manualmente mediante un software de análisis de imagen (Image J/Fiji; <http://fiji.sc/>). A continuación se procedió al análisis de las imágenes determinando el área delimitada por dichos contornos y se calculó el diámetro del círculo equivalente (DCE). Los valores de DCE se representaron como histogramas de frecuencia relativa que muestran la distribución de tamaño de los aglomerados. Para determinar el número de aglomerados internalizados por célula se examinaron tres campos (50-100 células por campo), seleccionados al azar de tres experimentos independientes.

La cantidad de polímero PEI acoplado a la superficie de las diferentes NPs se evaluó mediante análisis termogravimétrico, con una velocidad de calentamiento de 10°C/min en una atmósfera de flujo de nitrógeno, empleando el sistema TGA/SDTA 851 (Mettler Toledo, Barcelona, España).

Para el análisis del espectro de absorción de los distintos nanomateriales basados en oro en la región ultravioleta-visible-infrarrojo cercano (UV-VIS-NIR), se utilizó un espectrofotómetro modelo 8453 de Agilent® (Agilent Technologies Inc., Santa Clara,



CA, EE.UU.). La cuantificación de la cantidad de oro internalizada por células humanas se determinó a partir de la digestión de las muestras de células con una mezcla de ácido clorhídrico y ácido nítrico (3HCl:HNO<sub>3</sub>). La solución obtenida tras la lisis celular se analizó mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, del inglés *Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Como estándar para el análisis se utilizó TraceCERT® que contiene oro a una concentración de 1 mg/ml.

## 2. CULTIVOS CELULARES

En la realización de este estudio se ha utilizado la línea celular de osteosarcoma humano, Saos-2 (ATTC No. HTB-85), y la línea celular de carcinoma cervical humano, HeLa (ATCC No. CCL-2). A partir de ambos tipos celulares se generaron líneas celulares estables que expresan de forma constitutiva una proteína de localización endocítica (células Saos-2-pAcGFP-1-Endo) o de forma inducible, mediada por la aplicación de calor, la proteína fluorescente monomérica DsRed o la forma hiperfusogénica de la glicoproteína de membrana del virus de la leucemia de gibbon FMG-GALV (células HeLa-DsRed-Monómero o HeLa-GALV, respectivamente).

Las células Saos-2, HeLa y las líneas celulares derivadas se cultivaron en medio DMEM (Invitrogen, Barcelona, España) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Innogenetics, Barcelona, España), 100 UI/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina (Invitrogen) (DMEM-FBS) y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

### 2.1 Establecimiento de líneas celulares estables a partir de células Saos-2

La línea celular Saos-2-pAcGFP1-Endo se aisló tras la transfección estable del plásmido pAcGFP-1-Endo (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia), en células Saos-2. pAcGFP-1-Endo es un vector de expresión que codifica una proteína de fusión verde fluorescente *Aequorea coerulescens* (AcGFP1) fusionada con la proteína humana RhoB-GTPasa, la cual se localiza en la superficie de vesículas de la vía endocítica, bajo control del promotor de citomegalovirus (CMV).

Las células Saos-2 se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 100 mm y se cultivaron durante 24 h para permitir la adhesión celular. A continuación, se transfectaron con el plásmido pAcGFP-1-Endo combinado con

LipofectAMINA<sup>TM</sup>/Plus (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los transformantes se seleccionaron en medio de cultivo suplementado con 600 µg/ml de G418 (Invivogen, San Diego, California, EE.UU.). Se aislaron líneas celulares clonales independientes con capacidad proliferativa similar a las células parentales. La línea celular Saos-2-pAcGFP1-Endo se seleccionó mediante análisis por MCLB y se mantuvo de forma rutinaria en medio de cultivo suplementado con 600 µg/ml de G418. Para confirmar el marcaje específico de los endosomas en la línea celular generada, las células se trataron con transferrina y toxina colérica acopladas a AlexaFluor 594 (ambas de Invitrogen), marcadores específicos de la endocitosis mediada por vesículas de clatrina y de la mediada por caveolina, respectivamente. Para ello se sembraron las células Saos-2-pAcGFP1-Endo a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron durante 1 h en presencia de 10 µg/ml de toxina colérica o 50 µg/ml de transferrina, ambos agentes acoplados a fluorocromo. La visualización se llevó a cabo mediante MCLB como se describe en el apartado 7.

## 2.2 Establecimiento de líneas celulares estables a partir de células HeLa

Las células HeLa-DsRed-Monómero y HeLa-GALV se aislaron después de la transfección estable de los plásmidos HSP70B-DsRed-Monómero y HSP70B-GALV, respectivamente, en células HeLa. Las construcciones HSP70B-DsRed-Monómero y HSP70B-GALV albergan la secuencia del monómero DsRed y de FMG-GALV bajo el control del promotor del gen humano termosensible *HSP70B*. Para generar la construcción plasmídica HSP70B-DsRed-Monómero, un fragmento *HindIII-EcoRI* del plásmido pDsRed-Monómero (Clontech) que contiene la secuencia del ADN complementario (ADNc) de la proteína fluorescente monomérica DsRed, se insertó entre los sitios únicos *HindIII* y *EcoRI* de la construcción CMV-HSP70B, descrita previamente (Vilaboa y col., 2005). Para generar la construcción HSP70B-GALV, un fragmento del plásmido CMV-GALV (cedido por el Dr. Richard Vile, Clínica Mayo, Minnesota, EE.UU.) que contiene la secuencia del ADNc de FMG-GALV (Bateman y col., 2000), se amplificó por PCR empleando los oligonucleótidos 5'-GATATCTGCAAGCTTCGGCTTCTC y 5'-AGTGTGGTGGGAATTCGGCTTTC. El producto de PCR se digirió con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* y el fragmento resultante se insertó entre los sitios únicos *HindIII* y *EcoRI* de la construcción CMV-HSP70B.

Las células HeLa se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 100 mm y se cultivaron durante 24 h para permitir la adhesión celular. Las células se transfectaron con los plásmidos HSP70B-DsRed-Monómero o HSP70B-GALV combinados con LipofectAMINA™ 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los transformantes se seleccionaron en medio de cultivo suplementado con 600 µg/ml de G418 y se aislaron líneas celulares clonales independientes con capacidad proliferativa similar a las células parentales. La línea celular HeLa-DsRed-Monómero se seleccionó tras la aplicación de un choque térmico de 45°C durante 30 min en un baño de agua termostatzado y posterior incubación durante 24 h en una atmósfera a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa, analizándose a continuación la expresión de la proteína monomérica DsRed mediante MCLB. Para determinar la intensidad de la fluorescencia derivada de la expresión de la proteína DsRed-Monómero, se examinaron los valores de fluorescencia correspondientes a 50 células individuales mediante el software de análisis de imagen Image J/Fiji. La detección de muerte celular promovida por la expresión de FMG-GALV se determinó 3 días después de un choque térmico de idénticas características. Tras lavar dos veces las células con PBS, éstas se tiñeron y fijaron con el colorante cristal violeta al 0,5% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemania) en etanol al 20% (v/v) durante 15 min a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados con PBS necesarios para eliminar el exceso de colorante antes de la visualización mediante microscopía óptica (Olympus BX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japón), que permitió la selección de la línea celular HeLa-GALV. Además, el efecto citotóxico promovido por la expresión de FMG-GALV se cuantificó mediante el ensayo de alamarBlue™ (Biosource, Nivelles, Bélgica) como se describe en el apartado 4. Ambas líneas celulares derivadas de células HeLa se mantuvieron rutinariamente en medio de cultivo suplementado con 600 µg/ml de G418.

### **3. TRATAMIENTOS CELULARES**

Para los tratamientos con NPs, las células se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 48 pocillos y se cultivaron durante 24 h. Para los experimentos específicos que incluyen MCLB y MET,  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> se sembraron en cámaras de cultivo de 8 pocillos. Inmediatamente antes del tratamiento, las dispersiones de NPs a concentraciones que oscilaron entre 1 y 10 mg/ml se sonicaron a la máxima potencia durante 2 min en un baño de ultrasonidos (Branson 12, Branson Ultrasonidos SAE,

Barcelona, España), se resuspendieron en DMEM-FBS a la concentración final deseada y se agitaron vigorosamente con vórtex para asegurar una suspensión de partículas homogénea. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en DMEM-FBS conteniendo NPs.

Para los experimentos con los complejos NPs/ADN, se mezcló 1 ml de las suspensiones de NPs en tampón fosfato sódico 50 mM, pH = 7,4 (FS) con el plásmido correspondiente, a las concentraciones y cantidades indicadas, y se incubaron durante 1 h en un agitador orbital (Fisher Scientific, Afora, Madrid, España) a temperatura ambiente para permitir la unión electrostática del ADN a la superficie de las NPs. Las suspensiones se centrifugaron a 12000 rpm y 4°C durante 5 min y los complejos NPs/ADN se resuspendieron en 1 ml de DMEM-FBS. Para los tratamientos celulares con los complejos NPs/ADN, los cultivos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en 500 µl DMEM-FBS conteniendo los complejos centrifugados durante los periodos indicados. Para cuantificar la eficiencia de unión del ADN a las NPs, inmediatamente después de la centrifugación de los complejos NPs/ADN los sobrenadantes se recuperaron y se sometieron a un protocolo estándar de precipitación de ácidos nucleicos con etanol (Sambrook y Russel, 2001). La cantidad de ADN presente en la muestra se precipitó y se midió su densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). La eficiencia de unión del ADN a las NPs se calculó como porcentaje de ADN conjugado a las NPs frente a la cantidad total de ADN añadido.

En todos los experimentos en los que las células se trataron con NPs o complejos NPs/ADN, se emplearon como control células sometidas a las mismas manipulaciones experimentales en ausencia de tratamiento.

#### **4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD METABÓLICA**

Como criterio para determinar la actividad metabólica celular se empleó el reactivo comercial alamarBlue. Este sistema incorpora un indicador de óxido-reducción que en respuesta a la actividad metabólica celular cambia de color y es capaz de emitir fluorescencia. Los ensayos preliminares llevados a cabo en el laboratorio indicaron que los resultados obtenidos empleando alamarBlue o recuento microscópico de células viables utilizando azul tripán eran equivalentes. Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 3 h con alamarBlue al 10% en DMEM-FBS sin rojo fenol. Se recogió

el medio de cultivo y después de aplicar una excitación a 530 nm, se cuantificó la fluorescencia emitida a 590 nm usando un espectrofluorímetro Synergy4 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.). Para descartar la posible interferencia de las NPs con el reactivo alamarBlue, en todos los casos se incubaron suspensiones de las NPs a 0,5 mg/ml con el reactivo alamarBlue durante 3 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las suspensiones se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 5 min y la fluorescencia del sobrenadante se cuantificó como se ha descrito anteriormente.

## 5. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN TRANSITORIA CON NPs

Se conjugaron cinco plásmidos diferentes con distintos tipos de NPs: (i) pGL4.13 (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España), que codifica un ADNc de luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor del virus del simio 40 (SV40), (ii) Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 (Mirus, Madison, WI, EE.UU.), plásmido marcado con el fluoróforo Cy3 que permite la visualización directa del ADN mediante MCLB, (iii) pDsRed-Monómero-F Hyg (Clontech), vector de expresión que codifica una secuencia de 20 aminoácidos responsable de la señal de farnesilación de c-Ha-Ras y que se localiza en la pared interna de la membrana plasmática, fusionada con la región C-terminal del monómero DsRed, un mutante monomérico derivado de la proteína roja fluorescente *Discosoma sp. DsRed*, bajo el control del promotor CMV (iv) pEGFP-C1 (Clontech), que codifica una proteína verde fluorescente (EGFP) bajo el control del promotor CMV y (v) pORF-HSV1tk (Invivogen), vector de expresión que codifica la proteína timidina quinasa del virus del herpes simple tipo 1 (HSV1tk) bajo el control de un promotor quimérico que comprende el promotor del factor de elongación  $\alpha$ -1 y la región 5' no traducida del virus linfotrópico de células T humanas (hEF1-HTLV). Finalmente, el plásmido pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) se utilizó como soporte en ensayos de internalización celular analizados mediante MCLB y MET.

Para los ensayos de transfección, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron hasta 72 h con 500  $\mu$ l de DMEM-FBS conteniendo los complejos NPs/ADN. Como controles positivos de transfección se combinaron 245 ng de plásmido, en el caso de células Saos-2, ó 320 ng, en el caso de células HeLa, con 0,5  $\mu$ l del reactivo comercial LipofectAMINA<sup>TM</sup>/Reactivo Plus ó LipofectAMINA<sup>TM</sup> 2000 (ambos de Invitrogen), respectivamente, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En el caso concreto de los estudios realizados con las MSN-PEI, como control de la transfección se

ha utilizado el polímero catiónico PEI. Los complejos PEI/ADN se prepararon mediante la incubación de 18 µg de PEI, cantidad de polímero equivalente a la detectada en la superficie de las MSN-PEI utilizadas en los ensayos de transfección, en 25 µl de tampón FS durante 10 min a temperatura ambiente. En paralelo se incubaron cantidades crecientes del plásmido pGL4.13 durante 10 min a temperatura ambiente en 25 µl del mismo tampón, que se mezclaron con la solución de PEI. La mezcla de PEI/ADN se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para permitir el auto ensamblaje de los complejos.

La eficiencia de transfección se determinó por recuento de células que expresaban EGFP y DsRed-Monómero en cultivos transfectados con pEGFP-C1 y pDsRed-Monómero-F-Hyg, respectivamente. Se realizó un recuento de células totales utilizando el modo de campo claro de un microscopio de fluorescencia (Leica AF 6000, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) mientras que las células que expresaban los transgenes se detectaron empleando el modo de fluorescencia, lo que permitió calcular el porcentaje de células transfectadas. Se examinaron seis campos (150-200 células por campo) seleccionados al azar de tres experimentos independientes.

La actividad de la proteína luciferasa de luciérnaga se cuantificó utilizando un kit comercial (Luciferase Assay System, Promega Biotech Ibérica) en un luminómetro Wallac 1450 Microbeta Trilux (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.). Los resultados se normalizaron de acuerdo a los niveles de proteínas en los extractos, que se cuantificaron empleando el kit comercial BioRad® Protein Assay (BioRad, Madrid, España).

Para los ensayos de citotoxicidad inducida, las células se incubaron con complejos NPs/pORF-HSV1tk durante 48 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS dos veces y se incubaron durante 7 días en presencia o ausencia de medio DMEM-FBS que contenía 10 µg/ml de Ganciclovir (GCV, Invivogen). Al finalizar el ensayo, las células se tiñeron con cristal violeta y se analizaron como se ha descrito en el apartado 2.2.

## **6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Tras los tratamientos, las células se lavaron dos veces con PBS, y se fijaron durante 1 h con glutaraldehído al 3,5%. La post-fijación se realizó durante 1,5 h en tetraóxido de osmio al 1% a temperatura ambiente. Después de varias etapas de lavado

con tampón fosfato 0,1 M, la muestra se deshidrató en una serie gradual de etanol (30, 50, 70, 95 y 100% vol.) y óxido de propileno. Posteriormente la muestra se integró en una resina tipo Durcupan (Fluka, Sigma-Aldrich) cuya polimerización se llevó a cabo a 60°C durante 48 h. Las secciones, con un grosor aproximado de 60, nm se montaron en rejillas de níquel y se tiñeron con acetato de uranilo antes de su visualización en un microscopio JEOL JEM1010 (JEOL).

## **7. MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER DE BARRIDO**

Para visualizar los filamentos de actina, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min. Posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 15 min y se incubaron con faloidina conjugada con Atto 647N (Sigma-Aldrich) durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Adicionalmente, el ADN nuclear se tiñó con 4,6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich). Se realizaron secciones de 0,5  $\mu\text{m}$  a lo largo del eje z, obteniéndose imágenes en los planos x-z e y-z, que se analizaron utilizando el software Leica LAS AF, versión 2.0.1, build 2043.

La señal de fluorescencia emitida por el plásmido Label IT Cy<sup>TM</sup>3 se recogió en el rango de 549-570 nm después de excitar con la línea láser de 532 nm. Las NPs, o sus agregados, de tamaño superior al límite de resolución del confocal (258 nm en el plano xy) se visualizaron directamente utilizando el modo de reflexión del confocal, como se ha descrito en el apartado 1.4.

Las señales derivadas de la expresión de las proteínas fluorescentes codificadas por pAcGFP1-Endo y pEGFP-C1 se visualizaron tras la excitación con la línea láser de 488 nm, recogiendo la señal de emisión en el rango 475-505 nm. Las señales derivadas de la expresión de la proteína fluorescente DsRed codificada por pDsRed-Monómero-F Hyg y pDsRed se visualizaron tras excitar con la línea láser de 532 nm recogiendo la señal de emisión en el rango 557-585 nm.

Las señales emitidas por los marcadores de endocitosis Alexa-Fluor 594-toxina colérica y AlexaFluor 594-transferrina se recogieron en el rango 590-617 nm tras excitación con la línea láser de 532 nm.

Para los estudios de colocación de los complejos NPs/ADN y endosomas, se emplearon células Saos-2-pAcGFP1-Endo. Los estudios de colocación de las NIR-NPs y endosomas se llevaron a cabo en células HeLa, previamente transfectadas de

forma transitoria con el plásmido pAcGFP1-Endo y tratadas durante 24 h con las dosis indicadas de NPs. La evaluación de la colocalización de fluorocromos se realizó con el módulo de colocalización del software de Leica LAS AF, versión 2.0.1, Build 2043.

## **8. ENSAYOS DE HIPERTERMIA ÓPTICA**

### **8.1 Excitación fototérmica de las NIR-NPs**

Los incrementos de temperatura producidos en respuesta a la absorción de luz en la región NIR por parte de los diferentes tipos de NIR-NPs se determinaron empleando 300  $\mu$ l de dispersiones conteniendo concentraciones comprendidas entre 0,005 y 0,1 mg/ml de NIR-NPs resuspendidas en DMEM-FBS, que fueron expuestas directamente a la luz del láser NIR con una potencia de 2 W/cm<sup>2</sup> durante 10 min. La irradiación se realizó con un sistema de láser infrarrojo que consiste en un láser de diodo de 808 nm de longitud de onda acoplado a una fibra óptica de 400  $\mu$ m de diámetro (Optilas MDL-III-808-2W, Changchun Nuevas Industrias Optoelectrónica Technology Co., Ltd., Changchun, China) y un regulador de potencia (Modelo PD300-3W, Ofir Laser Measurement Group, Logan, UT, EE.UU.), todo ello integrado en el interior de una cámara termostatzada (Modelo Stuart SI60D, Fisher Scientific, Afora) para mantener la temperatura del ambiente de trabajo a 37°C. Los cambios de temperatura se monitorizaron mediante la inmersión en el medio de cultivo de un termopar tipo K (RS Amidata, Madrid, España).

### **8.2 Tratamiento fototérmico con laser NIR de células humanas**

Transcurrido el tiempo de incubación con las NIR-NPs, los cultivos se lavaron con PBS para eliminar las NPs no internalizadas por las células y se añadió medio DMEM-FBS fresco. Después, la monocapa celular se irradió desde la parte superior con un haz de luz NIR a una potencia de 2 W/cm<sup>2</sup> durante un periodo de hasta 60 min. Con los NRs-mPEG se llevó a cabo un ensayo adicional en el que no se realizó el paso de lavado previo a la exposición al láser, permaneciendo en el medio de cultivo durante la irradiación el material no internalizado en la célula. Inmediatamente después del tratamiento con el láser, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM-FBS fresco y las células se incubaron durante los tiempos indicados en una atmósfera de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.



### 8.3 Ablación fototérmica mediante irradiación NIR

La viabilidad celular se determinó en células HeLa tratadas con dosis de 0,05 y 0,1 mg/ml de NIR-NPs y expuestas a láser NIR durante 30 min, como se ha descrito en el apartado 8.2, mediante tinción celular con calceína y yoduro de propidio, que permiten la distinción entre células viables y dañadas, respectivamente. Las células adheridas se lavaron con PBS y se trataron durante 30 min con acetoximetil éster de calceína  $8 \times 10^{-3}$  M (Calceína-AM, Sigma-Aldrich) y yoduro de propidio  $1 \times 10^{-3}$  M (IP, Sigma-Aldrich), disueltos en DMEM-FBS, en un incubador humidificado a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Posteriormente, las muestras se lavaron cuidadosamente con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se visualizaron mediante MCLB. Para determinar el mecanismo de muerte celular se realizó una tinción de caspasa-3 activa. Las células permeabilizadas se incubaron con BSA al 1% en PBS durante 1 h para bloquear las uniones inespecíficas y a continuación con el anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3 humana conjugado con Alexa 488 (Cell Signaling Tech, Beverly, MA, EE.UU.), diluido en BSA al 1% en PBS. Después de lavar con Tween 20 al 0,05% en PBS, las células se incubaron con faloidina conjugada con Atto 647N (Sigma-Aldrich) para la visualización del citoesqueleto de actina. En ambos casos las muestras se examinaron mediante MCLB.

### 8.4 Expresión transgénica inducida mediante las NIR-NPs

Para evaluar la expresión génica inducida por las NIR-NPs, las células HeLa-DsRed-Monómero se trataron con dosis de 0,005, 0,01 y 0,05 mg/ml de NIR-NPs y se irradiaron con luz NIR durante 15, 30 y 60 min, como se describe en el apartado 8.2. Transcurrido el tiempo de incubación las células se fijaron y permeabilizaron como se describe en el apartado 7. Para la visualización del citoesqueleto de actina las células se incubaron con faloidina conjugada con Atto 425 (Sigma-Aldrich). La presencia de las NIR-NPs y la señal de fluorescencia derivada de la expresión de la proteína DsRed-Monómero se visualizaron por MCLB, como se describe en los apartados 1.4 y 7, respectivamente.

Para analizar la actividad antiproliferativa de cultivos celulares expuestos a hipertermias ópticas subletales y letales, las células HeLa-GALV se trataron con dosis de 0,01 y 0,1 mg/ml de NIR-NPs y se irradiaron con luz NIR durante 30 min, como se describe en el apartado 8.2. Las células se tiñeron con cristal violeta y la visualización se llevó a cabo mediante microscopía óptica como se ha descrito en el apartado 2.2. El

análisis de las imágenes mediante el software Image J/Fiji permitió cuantificar el tamaño del área de ablación (mm<sup>2</sup>) en la capa celular.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los experimentos que lo han requerido, los resultados numéricos se exportaron al programa GraphPad Prism 5.00-TRIAL (La Jolla, CA, EE.UU.) donde se llevó a cabo el análisis estadístico. Los resultados descritos en el texto se han expresado como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Las diferencias entre grupos se estudiaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. El test *post hoc* de Bonferroni se utilizó para aislar diferencias específicas. Valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## ***RESULTADOS***

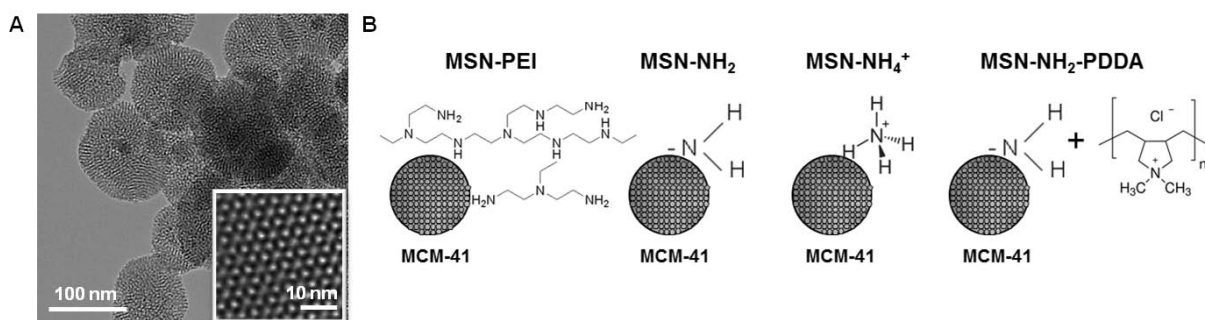


## 1. OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN DE MSN MEDIANTE FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL

La funcionalización superficial de MSN con moléculas cargadas positivamente a pH fisiológico es una estrategia que maximiza la capacidad de conjugación electrostática del material a moléculas de ácidos nucleicos, cargadas negativamente, con el objetivo de favorecer la transferencia del material genético conjugado a células humanas. Las propiedades físicas de los materiales tales como su densidad de carga, tamaño y estabilidad coloidal, entre otras, son parámetros de gran importancia que determinan su eficacia como agentes de transfección (Tan y col., 2007). En este apartado nos propusimos investigar la influencia de estos parámetros en la capacidad de transfección de MSN funcionalizadas.

### 1.1 Caracterización de las MSN funcionalizadas

La caracterización morfológica completa de las MSN utilizadas en este trabajo se realizó con anterioridad por el grupo NFP-INA (Yagüe y col., 2008). Las NPs de MCM-41 presentan una estructura con un tamaño de partícula promedio de  $130 \pm 20$  nm y un volumen de poro de  $0,98 \text{ cm}^3/\text{g}$ . La morfología de las MSN funcionalizadas (MSNF) se caracterizó mediante MET observándose su conformación esférica y altamente porosa (Fig. 7).



**Figura 7.** Caracterización del material MCM-41. (A) Morfología de las MSN sin funcionalizar observada mediante MET. La caja muestra un detalle ampliado de la estructura mesoporosa del material. (B) Representación esquemática de las MSN funcionalizadas con -PEI, -NH<sub>2</sub>, -NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y -NH<sub>2</sub>-PDDA.

Los valores de carga superficial tras la resuspensión en agua de las MSN unidas covalentemente a grupos amino primarios (MSN-NH<sub>2</sub>) o cuaternarios (MSN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y de las MSN recubiertas con polímeros catiónicos como PDDA (MSN-NH<sub>2</sub>-PDDA) o PEI (MSN-PEI) se muestran en la Tabla 2. Se observó que tanto la adición de grupos -NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a la superficie de las MSN como el recubrimiento con PEI o -NH<sub>2</sub>-PDDA resultan en un incremento de potencial zeta mayor que el observado tras la funcionalización con grupos -NH<sub>2</sub>. Sin embargo, el perfil de cargas superficiales que muestran las MSNF en agua experimentó un cambio drástico tras su dispersión en DMEM-FBS. En este solvente rico en proteínas, todas las especies de MSNF mostraron una acusada disminución de su potencial zeta, generándose una inversión de polaridad de sus cargas netas superficiales con la excepción de las MSN-PEI, cuyo potencial zeta se mantuvo en rangos positivos. La incubación de MSNF con moléculas plasmídicas aumentó la densidad de las cargas negativas en la superficie de todos los materiales ensayados, presentando las MSN-PEI una inversión de polaridad de su carga neta superficial como consecuencia de las cargas negativas aportadas por los ácidos nucleicos adsorbidos.

	Potencial Zeta (mV)		
	H <sub>2</sub> O	DMEM-FBS	DMEM-FBS*
MSN-PEI	36,62	15,88	-19,31
MSN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	27,91	-11,05	-16,42
MSN-NH <sub>2</sub>	5,40	-4,18	-10,85
MSN-NH <sub>2</sub> -PDDA	39,85	-9,16	-13,34

**Tabla 2.** Cuantificación del potencial zeta de las MSNF. Los datos mostrados en la tabla representan la media de tres determinaciones independientes para cada tipo de nanomaterial. \* = Valores obtenidos tras la conjugación del plásmido pGL4.13 a la superficie de las MSNF.

El intervalo de tamaños de las NPs de sílice utilizadas como agentes de transfección de células humanas descrito en bibliografía es bastante amplio, con diámetros que se extienden desde los 15-20 nm (Bharali y col., 2005) hasta los 250 nm (Radu y col., 2004). De acuerdo a los datos obtenidos mediante MET, el tamaño medio de las MSN estudiadas en este trabajo ocupa una posición central dentro de este rango de distribución. Además, es necesario un preciso control sobre la agregación de las NPs, fuertemente influenciada por la naturaleza del medio acuoso donde se encuentra inmerso el material (Díaz y col., 2008).

La Tabla 3 muestra los porcentajes de intensidad correspondientes a los radios hidrodinámicos de las distintas poblaciones de estructuras nanoparticuladas presentes en suspensiones en agua y DMEM-FBS. Se observa que la distribución de tamaños depende en gran medida del tipo de funcionalización y del medio de dispersión utilizado. Así, todas las MSNF presentaron un cierto grado de aglomeración en agua. Se observó que la mayoría de las partículas formaban parte de aglomerados de tamaño igual o superior a 300 nm, excepto en el caso de MSN-PEI, donde el 88% del material en suspensión mantuvo un tamaño próximo al de las NPs individuales. No obstante, el radio hidrodinámico de las MSNF tendió a aumentar cuando se resuspendieron en DMEM-FBS. En este medio se observó que las distintas especies de MSNF, a excepción de las MSN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, conformaban aglomerados de gran tamaño. Estos aglomerados representan la fracción mayoritaria de las poblaciones de las MSN-PEI, MSN-NH<sub>2</sub> y MSN-NH<sub>2</sub>-PDDA (60%, 43% y 57%, respectivamente). Asimismo, se observó la existencia de poblaciones de tamaño inferior a 100 nm, que pueden ser atribuidas al recubrimiento liberado, debido a la competencia por la carga positiva que podrían ejercer proteínas e iones del medio cargados negativamente o, alternativamente, a la floculación de componentes del medio de cultivo tras la adición de las MSNF. Para comprobar esta hipótesis, se añadieron al medio de cultivo concentraciones equivalentes de las moléculas catiónicas utilizadas para funcionalizar las MSN, observándose la aparición de agregados de diámetro inferior a 100 nm, similares a los detectados en presencia de las MSNF (datos no mostrados).

Finalmente, se estudió el radio hidrodinámico de los complejos MSNF/ADN dispersos en medio DMEM-FBS. En general, la unión del plásmido a las MSNF dio lugar a una disminución de la fracción que presentaba un mayor tamaño de aglomerados. Este efecto fue particularmente notable en las suspensiones de los complejos MSN-PEI/ADN, especie en la que el tamaño de la fracción mayoritaria de la población pasó de 2412 nm (60%) a 229 nm (66%). Este resultado proporciona un valor añadido a este tipo de funcionalización, con la que se mantiene la carga positiva de las NPs cuando se resuspenden en medio DMEM-FBS y que tras la conjugación de las MSN con moléculas de plásmido da lugar a una aglomeración reducida.

	Radio hidrodinámico (nm)		
	H <sub>2</sub> O (% Intensidad)	DMEM-FBS (% Intensidad)	DMEM-FBS* (% Intensidad)
MSN-PEI	164 / (87,7) 722 / (12,3)	38 / (2,3) 144 / (2,6) 782 (35,4) 2412 / (59,7)	34 / (2,6) 229 / (65,7) 3224 / (31,7)
MSN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	63 / (3) 387 / (85,5) 6967** / (11,2)	39 / (2,4) 85 / (11,4) 267 / (59,7)	21 / (1,4) 152 / (55,2) 378 / (43,4)
MSN-NH <sub>2</sub>	168 / (4,6) 373 / (92,1) 3134 / (3,3)	115 / (22,9) 367 / (34) 3712 / (43,1)	133 / (4,3) 749 / (72,1) 5623 / (23,6)
MSN-NH <sub>2</sub> -PDDA	54 / (2,2) 401 / (97,8)	70 / (5,6) 205 / (37,2) 1830 / (57,3)	33 / (1,4) 804 / (41,8) 4000 / (56,9)

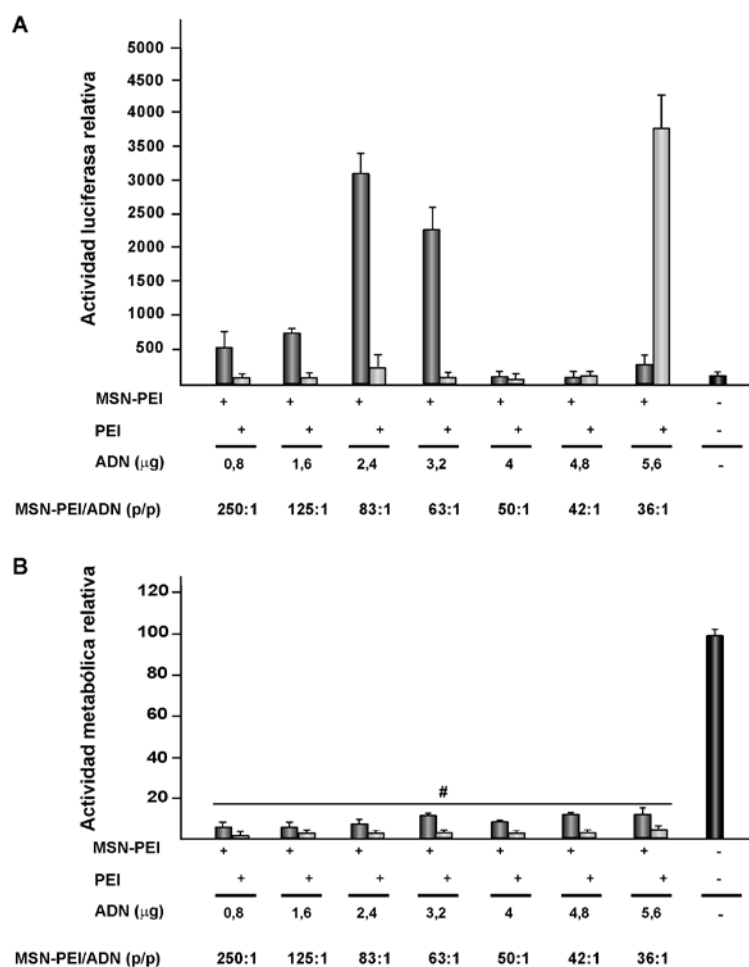
**Tabla 3.** Distribución del tamaño de partícula de las MSNF. Los resultados se obtuvieron empleando dispersiones de MSNF o complejos MSNF/ADN a 0,5 mg/ml. El porcentaje de cada sub-población en las muestras se indica entre paréntesis. Como ejemplo, la distribución del tamaño de partícula en la población de MSN-PEI disuelta en H<sub>2</sub>O muestra una distribución bimodal donde el 87,7% del total de partículas presenta un radio hidrodinámico de 164 nm y el 12,3% restante representa una sub-población con un radio hidrodinámico de 722 nm. \* = Valores obtenidos tras la conjugación del plásmido pGL4.13 a la superficie de MSNF. \*\* = El límite superior del equipo es de 6  $\mu$ m.

## 1.2 Influencia de la funcionalización superficial de las MSN sobre la eficiencia de transfección de células humanas

Con el objetivo de estudiar la capacidad de las MSN-PEI, MSN-NH<sub>2</sub>, MSN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y MSN-NH<sub>2</sub>-PDDA para transferir genes a células osteoblásticas humanas, estos materiales fueron conjugados a plásmidos que codifican diferentes genes testigo que se expresan bajo el control de promotores virales, activos constitutivamente. Tras la conjugación de las distintas especies de MSNF con cantidades crecientes de plásmido pGL4.13, las células se expusieron a los complejos MSN/ADN resultantes durante 24 h. Los cultivos se lavaron y las células se cultivaron durante un periodo adicional de 48 h, tras el cual se determinaron sus niveles de actividad luciferasa. Solamente se detectó actividad enzimática en los extractos proteicos procedentes de cultivos tratados con complejos formados por el plásmido pGL4.13 y MSN funcionalizadas con PEI. La adsorción de diferentes cantidades de plásmido a una masa de 250  $\mu$ g de MSN-PEI resuspendida en 500  $\mu$ l de medio acuoso permitió establecer una condición experimental óptima de transfección. Los resultados reflejados en la Fig. 8A indican que una masa de 2,4  $\mu$ g del plásmido es la cantidad óptima del biopolímero que tras ser conjugada con 250  $\mu$ g del material MSN-PEI, equivalente a un ratio NP/ADN de 83:1 (p/p), maximiza la capacidad de transfección de los complejos. Como control se evaluó



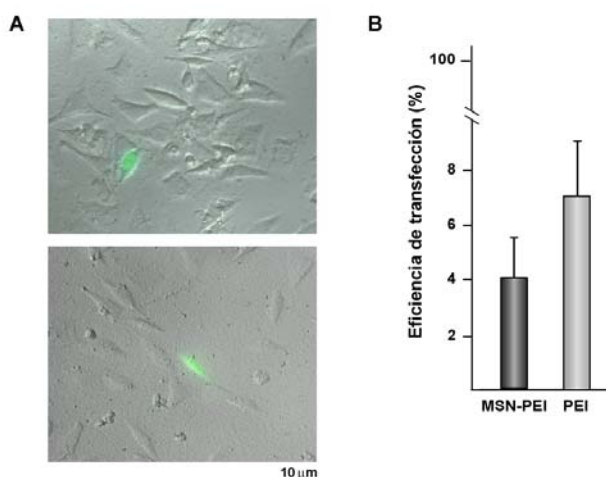
la eficiencia de transfección obtenida empleando 18  $\mu\text{g}$  de PEI, cantidad presente en la superficie de las MSN-PEI utilizadas en los ensayos de transfección y determinada por termogravimetría, combinada con las mismas cantidades del plásmido pGL4.13 adsorbidas a las MSN-PEI. Los resultados mostrados en la Fig. 8A indicaron que era necesaria una masa de 5,6  $\mu\text{g}$  de ADN para generar complejos PEI/pGL4.13 capaces de inducir niveles de actividad luciferasa similares a los obtenidos con los complejos MSN-PEI/pGL4.13 de ratio óptimo.



**Figura 8.** Influencia de los complejos MSN-PEI/ADN y PEI/ADN sobre la capacidad de transfección y viabilidad celular. Las células se trataron (+) o no (-) durante 24 h con 250  $\mu\text{g}$  de MSN-PEI, o 18  $\mu\text{g}$  de PEI, conjugados con las cantidades indicadas de pGL4.13, se lavaron con PBS, y se incubaron en DMEM-FBS durante 48 h. (A) La capacidad de transfección de MSN-PEI y PEI en células Saos-2 se analizó mediante ensayos de actividad luciferasa. Los resultados se expresan como actividad relativa de luciferasa por  $\mu\text{g}$  de proteína. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. (B) Actividad metabólica. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de fluorescencia determinado en células no tratadas y cultivadas durante 2 días, al cual se le asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. # $p < 0,05$  respecto a células no tratadas.

Los niveles de actividad enzimática obtenidos tras la incubación de las células con MSN-PEI/pGL4.13 y PEI/pGL4.13 son relativamente bajos, probablemente a consecuencia del descenso significativo de la viabilidad celular tras el tratamiento con los complejos portadores de PEI, lo que sugiere la existencia en los cultivos de un bajo porcentaje de células transfectadas cuya capacidad para expresar la proteína transgénica no está comprometida (Fig. 8B).

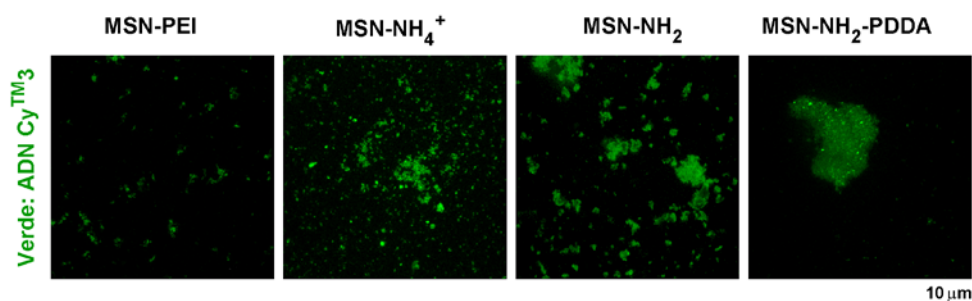
La eficiencia de transfección de las MSN-PEI en células humanas se calculó determinando el porcentaje de células Saos-2 que expresan la proteína fluorescente EGFP tras su incubación con los complejos MSN-PEI/pEGFP-C1 a un ratio NP/ADN 83:1 (p/p) (Fig. 9A). Los resultados indicaron que un 4% de células expresan la proteína EGFP, eficiencia similar a la detectada cuando se emplearon los complejos PEI/pEGFP-C1 en relación PEI/ADN 36:1 (p/p) (Fig. 9B).



**Figura 9.** Eficiencia de transfección de MSN-PEI y PEI. (A) Imágenes representativas de cultivos tratados durante 24 h con 250 µg de MSN-PEI conjugados a 2,4 µg del plásmido pEGFP-C1 (imagen superior) o con 18 µg de PEI conjugado a 5,6 µg del plásmido pEGFP-C1 (imagen inferior). Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 2 días en DMEM-FBS. (B) Eficiencia de transfección de MSN-PEI y PEI conjugados a plásmido en las mismas condiciones que en (A), indicada como porcentaje de células que expresan la proteína EGFP. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

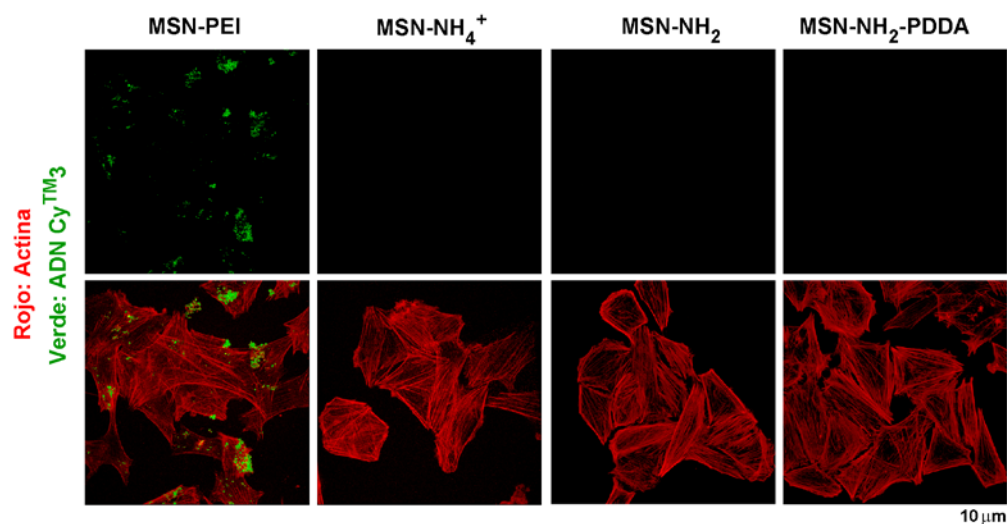
La internalización de los complejos NPs/ADN al interior celular es requisito imprescindible para una eficiente transferencia del material genético. Con el objetivo de analizar la vinculación de este fenómeno a la capacidad de transfección de los materiales funcionalizados, exploramos la internalización de los complejos MSNF/ADN en células Saos-2. En primer lugar, las diferentes MSNF se conjugaron con el plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3, marcado con el fluoróforo Cy3, y los complejos resultantes se

visualizaron directamente por MCLB. Como se muestra en la Fig. 10, los conjugados derivados de las MSN-PEI proporcionaron la mejor dispersión de las moléculas plasmídicas, mientras que con el resto de materiales, MSN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, MSN-NH<sub>2</sub> y MSN-NH<sub>2</sub>-PDDA, se detectó una mayor aglomeración de las moléculas de ácido nucleico. Es importante señalar que los datos obtenidos mediante PCS y MCLB proporcionan información diferente y a la vez complementaria sobre el tamaño de los aglomerados de los complejos MSNF/ADN. Mientras que la técnica PCS mostró los radios hidrodinámicos de las dispersiones, el análisis mediante MCLB permite identificar el estado de aglomeración de los complejos que presentan el plásmido acoplado a su superficie.



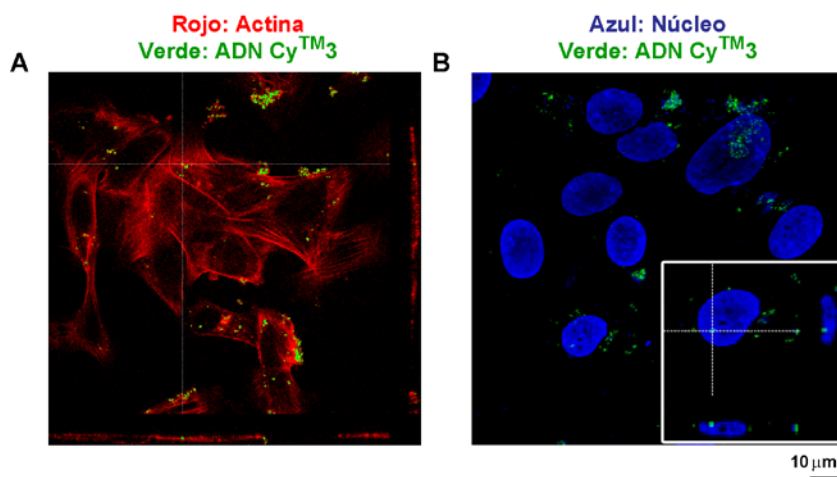
**Figura 10.** Adsorción de plásmido a la superficie de las MSNF. Se mezclaron suspensiones conteniendo 250  $\mu\text{g}$  de MSNF con 1,1  $\mu\text{g}$  del plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 y 1,3  $\mu\text{g}$  del pBluescript. Los conjugados se visualizaron directamente por MCLB. Las proyecciones máximas muestran el plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 (verde).

A continuación, las células Saos-2 se trataron con los distintos complejos MSNF/Label IT®Cy<sup>TM</sup>3 y se observó el plásmido fluorescente internalizado por las células mediante MCLB. Únicamente se detectó señal procedente del plásmido Label IT®Cy<sup>TM</sup>3 tras el tratamiento con los complejos MSN-PEI/ADN. No pudo detectarse la señal cuando los complejos se prepararon usando las MSN-NH<sub>2</sub>, MSN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, y MSN-NH<sub>2</sub>-PDDA, posiblemente debido a la formación de aglomerados de MSN/ADN de gran tamaño que no pueden ser internalizados y son eliminados de los cultivos durante los procesos de lavado de las muestras (Fig. 11).



**Figura 11.** Detección de moléculas de plásmido en células tratadas con los complejos MSNF/ADN. Las células Saos-2 se incubaron durante 24 h en presencia de 250 µg de las diferentes MSNF conjugadas a 1,1 µg del plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 y 1,3 µg del pBluescript, se lavaron con PBS y se incubaron durante 2 días con DMEM-FBS. Las proyecciones máximas muestran el plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 (verde) y tinción de actina (rojo).

El análisis tridimensional de las imágenes, mediante el seccionamiento óptico a lo largo de los ejes xyz, confirmó la localización intracelular del plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 previamente conjugado a las partículas MSN-PEI (Fig. 12A). La Fig. 12B muestra la localización nuclear de la señal fluorescente procedente del plásmido transferido por estas NPs.



**Figura 12.** Internalización celular de moléculas de plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 adsorbidas a la superficie de las MSN-PEI. Las células Saos-2 se incubaron durante 24 h en presencia de 250 µg de MSN-PEI conjugadas a 1,1 µg del plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 y 1,3 µg del pBluescript, se lavaron con PBS y se incubaron durante 2 días con DMEM-FBS. (A) El seccionamiento óptico de células a lo largo del eje x-z (panel inferior) e y-z (panel derecho) muestra la actina (rojo) y moléculas de plásmido fluorescente internalizadas (verde). (B) La proyección máxima muestra núcleos teñidos con DAPI (azul) en los que se localiza el plásmido fluorescente. Se muestra una reconstrucción tridimensional realizada mediante seccionamiento óptico a lo largo del eje x-z (panel inferior) e y-z (panel derecho) de la imagen, ampliada 1,5x.

## **2. OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN DE GNPs MEDIANTE FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA**

En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior con el material MSN, a continuación nos propusimos estudiar la influencia de la funcionalización con PEI de GNPs, con el fin de explorar su eficacia como vectores no virales en células osteoblásticas humanas. Se estudió en detalle la influencia del tamaño de partícula, que repercute acusadamente en la capacidad de internalización del material y por tanto, en la eficiencia de transfección de GNPs (Khlebtsov y Dykman, 2011; Chithrani, 2010). Para ello, se emplearon GNPs funcionalizadas con PEI cuyos diámetros estaban comprendidos entre 10 y 100 nm aproximadamente.

### **2.1 Caracterización de las GNPs**

Las GNPs de diámetro inferior a 10 nm ( $\text{GNPs} < 10 \text{ nm}$ ) fueron preparadas por el grupo NFP-INA, utilizando citrato que actuaba como reductor y estabilizador de la síntesis. El material mostró una distribución del tamaño de partícula en torno a los 9 nm de diámetro (Fig. 13A). Tras la funcionalización de las  $\text{GNPs} < 10 \text{ nm}$  con PEI ( $\text{GNPs-PEI} < 10 \text{ nm}$ ) en una reacción en la que el polímero se utilizó como agente reductor y estabilizador, la distribución del tamaño de partícula se centró alrededor de los 6 nm de diámetro (Fig. 13A). Por otra parte, la conjugación de PEI a las GNPs comerciales, con diámetro medio de 70 nm, no alteró de manera significativa la distribución del tamaño de la población de las GNPs funcionalizadas (Fig. 13B), que se denominaron  $\text{GNPs-PEI} < 100 \text{ nm}$ . La cantidad de PEI presente en la superficie de las  $\text{GNPs-PEI} < 10$  y  $< 100 \text{ nm}$  fue de  $14 \pm 2\%$  y  $5,5 \pm 7\%$  (p/p), respectivamente, determinado mediante análisis termogravimétrico.

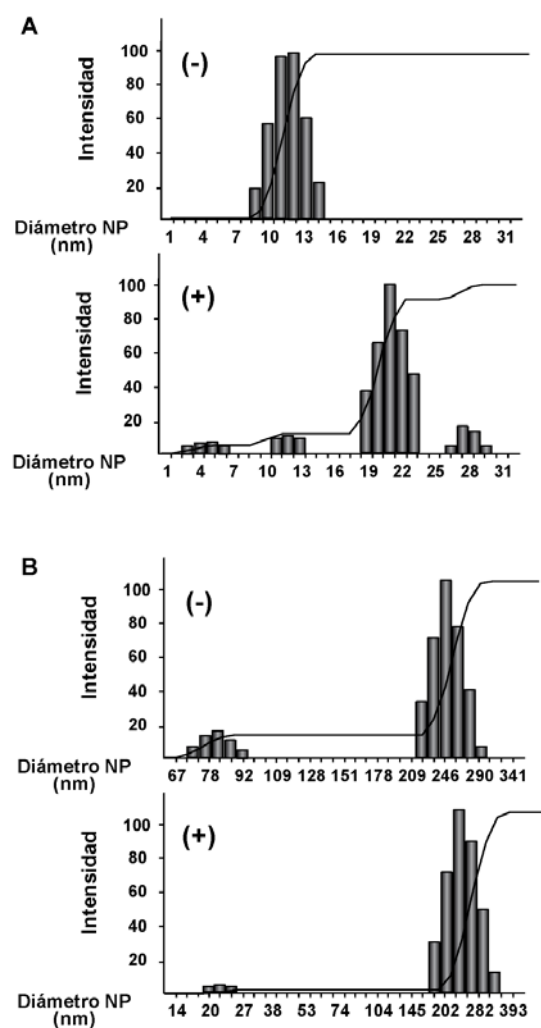
60

agua. Los valores obtenidos, -14 mV para las GNPs-PEI < 100 nm y -13 mV para las GNPs-PEI < 10 nm, confirmaron que la inversión de carga era inducida mayoritariamente por la adsorción de ADN plasmídico a las GNPs.

	Potencial Zeta (mV)				
	H <sub>2</sub> O	FS 50 mM pH = 7,4	DMEM-FBS	DMEM-FBS*	H <sub>2</sub> O*
<b>GNPs-PEI &lt; 100 nm</b>	22	18	-9	-12	-14
<b>GNPs-PEI &lt; 10 nm</b>	36	33	-1	-12	-13

**Tabla 4.** Cuantificación del potencial zeta de las GNPs-PEI. Los datos mostrados en la tabla representan la media de tres determinaciones independientes para cada GNPs-PEI. \* = Valores obtenidos tras la conjugación de plásmido pGL4.13 a la superficie de las GNPs-PEI.

La distribución del tamaño de partícula de dispersiones de las GNPs-PEI en DMEM-FBS, adsorbidas o no al plásmido pGL4.13, se muestra en la Fig. 14. En ambos casos, se detectó que los materiales presentaban en DMEM-FBS un diámetro medio de partícula mayor que en agua, lo que informó de un cierto grado de aglomeración de las nanoestructuras. El tamaño medio de las GNPs-PEI < 10 nm aumentó después de la formación de los complejos NPs/ADN, mostrando una distribución del tamaño de partícula en torno a 20 nm de diámetro (Fig. 14A). Por el contrario, la distribución del tamaño de partícula de las GNPs-PEI < 100 nm permaneció sin cambios tras la incubación con el plásmido (Fig. 14B). A diferencia de las MSN, las GNPs mostraron un grado de aglomeración mucho menor en DMEM-FBS, probablemente debido a la ausencia de grupos hidroxilo superficiales que podrían dar lugar a la asociación con otras moléculas mediante la formación de puentes de hidrógeno.



**Figura 14.** Distribución del tamaño de partícula de las GNPs-PEI antes y después de la adsorción de moléculas plasmídicas. Distribución del tamaño de partícula de dispersiones conteniendo 0,5 mg de GNPs-PEI < 10 (A) y < 100 nm (B) en 1 ml de DMEM-FBS, antes (-) y después (+) de la adsorción de 12  $\mu$ g del plásmido pGL4.13.

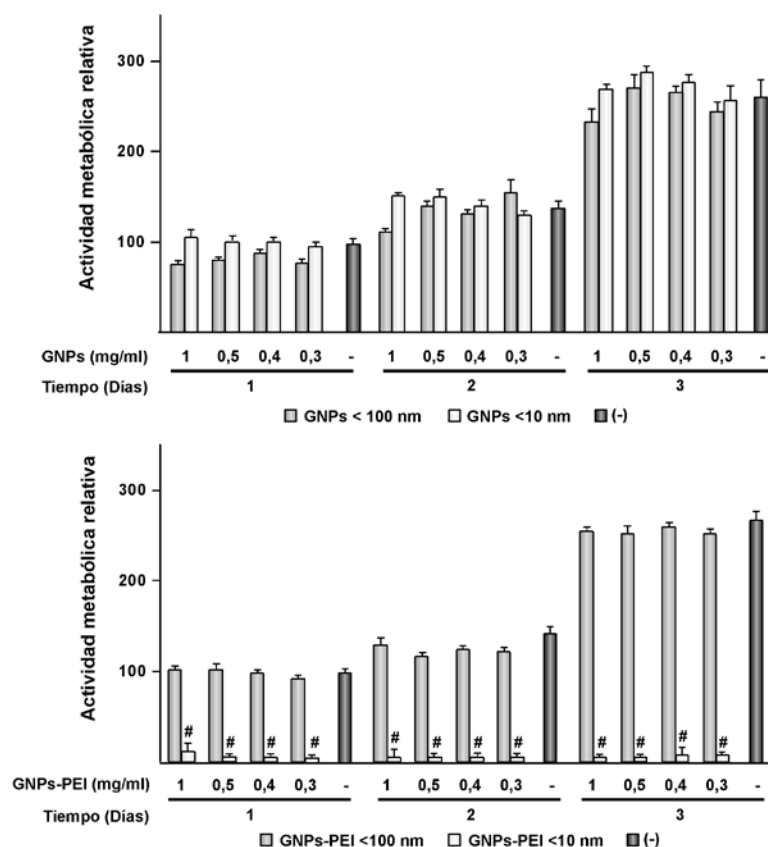
La cantidad de ácidos nucleicos conjugados a cada tipo de GNPs-PEI se calculó determinando el ADN presente en los sobrenadantes tras la adsorción de 12  $\mu$ g de ADN a 0,5 mg de NPs. Bajo idénticas condiciones experimentales, las GNPs-PEI < 10 nm adsorbieron la práctica totalidad del plásmido, mientras que las GNPs-PEI < 100 nm sólo fueron capaces de cargar el 45% de moléculas.

## 2.2 Influencia de la funcionalización superficial y el tamaño de las GNPs sobre la eficiencia de transfección de células humanas

La influencia de la funcionalización de las GNPs con PEI y posterior conjugación a moléculas plasmídicas sobre la biocompatibilidad del compuesto se evaluó tras la exposición de cultivos de células Saos-2 a las nanoestructuras y posterior



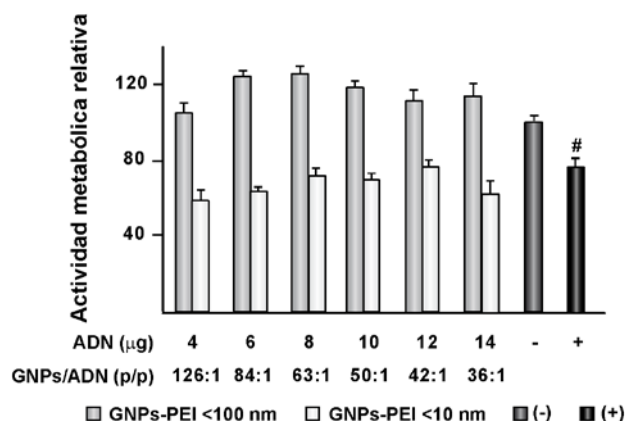
incubación con el reactivo alamarBlue. El tratamiento con las GNPs de tamaños  $< 10$  o  $< 100$  nm no tuvo efectos significativos en la actividad metabólica de las células a las dosis de partículas ensayadas, corroborando la excelente biocompatibilidad de los nanomateriales basados en oro (Fig. 15, panel superior). Por otra parte, se observó que el tratamiento con las GNPs-PEI  $< 100$  nm tampoco repercutía de manera significativa en la viabilidad celular. Sin embargo, la incubación con las GNPs-PEI  $< 10$  nm disminuyó drásticamente el número de células viables (Fig. 15, panel inferior).



**Figura 15.** Influencia de las GNPs y GNPs-PEI sobre la viabilidad celular. Las células Saos-2 se trataron o no (-) durante 1-3 días con las dosis indicadas de las GNPs (panel superior) o GNPs-PEI (panel inferior). Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de fluorescencia determinado en cultivos no tratados después de 1 día de cultivo, al cual se le asigna un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. # $p < 0,05$  respecto a células no tratadas.

La adsorción de moléculas de plásmido a la superficie de las GNPs-PEI  $< 10$  nm redujo notablemente su citotoxicidad, independientemente del ratio NPs/ADN (p/p) ensayado, mientras que la buena biocompatibilidad de las GNPs-PEI  $< 100$  nm no se vio afectada (Fig. 16). Todos los agentes de transfección disponibles comercialmente generan en mayor o menor medida cierto grado de citotoxicidad. Se compararon los niveles de actividad metabólica de células Saos-2 incubadas con los complejos

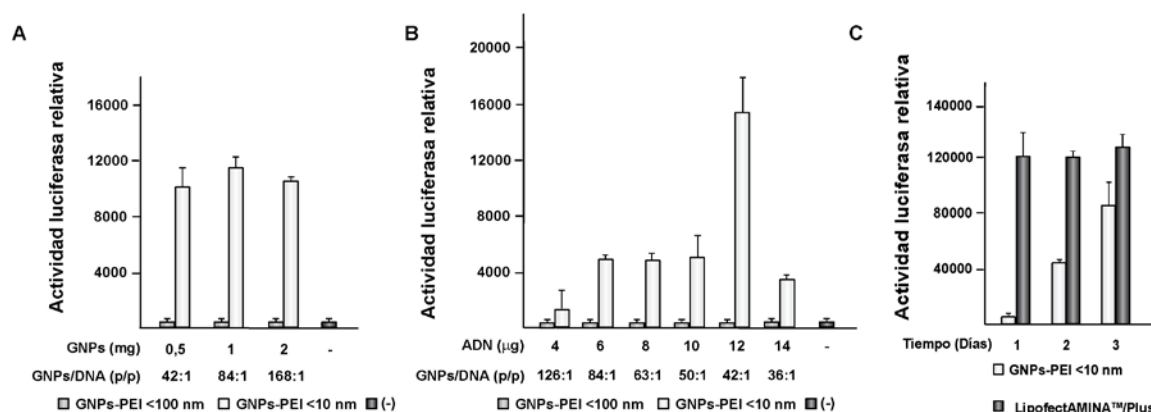
GNPs-PEI/ADN con los de células transfectadas con el reactivo LipofectAMINA<sup>TM</sup>/Plus, empleado rutinariamente en nuestro laboratorio para transfectar este tipo celular. Los resultados indicaron que el perfil de toxicidad de los complejos GNP-PEI < 10 nm era similar al mostrado por los conjugados generados a partir del reactivo comercial (Fig. 16).



**Figura 16.** Influencia de los complejos GNP-PEI/ADN sobre la viabilidad celular. Células tratadas o no (-) durante 1 día con complejos que contienen 0,5 mg de GNP-PEI conjugados a las cantidades indicadas del plásmido pGL4.13, o tratadas con 0,5 μl de LipofectAMINA<sup>TM</sup>/Plus conjugados a 245 ng del mismo plásmido (+). Se indica la relación GNP-PEI/ADN (p/p) correspondiente. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de fluorescencia determinado en células no tratadas después de 1 día de cultivo, al cual se le asigna un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media ± DE de tres experimentos independientes. #p < 0,05 respecto a células tratadas con los complejos GNP-PEI < 100 nm/ADN, en todas las condiciones experimentales ensayadas.

Tras la conjugación de las GNP-PEI de tamaño < 10 y < 100 nm al plásmido testigo pGL4.13, las células se expusieron a los complejos NP/ADN resultantes durante 24 h. Los cultivos se lavaron y las células se cultivaron durante un periodo adicional de 48 h, tras el cual se determinaron sus niveles de actividad luciferasa. Como se muestra en la Fig. 17, la actividad enzimática se detectó en células incubadas con los complejos GNP-PEI < 10 nm/pGL4.13 pero no en células incubadas con los complejos derivados de las GNP-PEI < 100 nm. Con el fin de optimizar la eficiencia de transfección obtenida empleando las GNP-PEI < 10 nm, se prepararon complejos utilizando cantidades de NPs comprendidas entre 0,5 y 2 mg y una cantidad fija del plásmido pGL4.13 de 12 μg (Fig. 17A). La actividad luciferasa fue similar en todas las condiciones ensayadas. A continuación, se adsorbieron diferentes cantidades del plásmido pGL4.13 a 0,5 mg de GNP-PEI < 10 nm, lo que permitió detectar que la relación NP/ADN 42:1 (p/p) inducía la mayor actividad enzimática en células

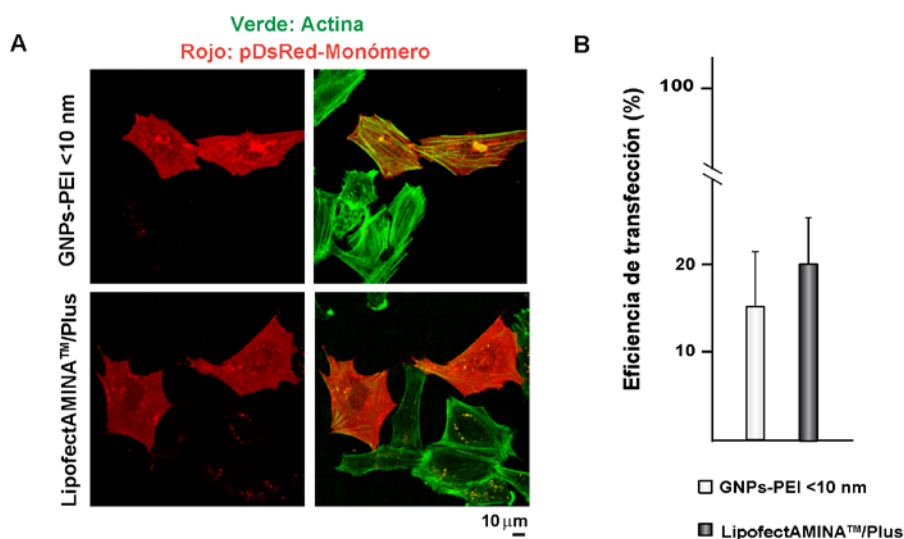
transfectadas (Fig.17B), estableciéndose estas condiciones para la realización de los posteriores ensayos de transfección. Por el contrario, las GNPs < 10 y < 100 nm sin recubrimiento de PEI a las que se adsorbió el plásmido pGL4.13 como se describe más arriba, no indujeron actividad luciferasa en cultivos de células Saos-2 (datos no mostrados). La interpretación conjunta de estos resultados indica que el acoplamiento del polímero catiónico PEI a las especies de GNPs ensayadas es un requerimiento imprescindible para mediar la condensación de moléculas de plásmido sobre la superficie de las partículas de forma que los conjugados resultantes puedan actuar como agentes de transfección eficientes.



**Figura 17.** Transfección mediada por los complejos GNPs-PEI/ADN. (A-C) La capacidad de transfección de las GNPs-PEI < 10 y < 100 nm en células Saos-2 se analizó mediante ensayos de actividad luciferasa. (A) Se conjugaron 12 µg del plásmido pGL4.13 a las cantidades indicadas de las GNPs-PEI. Las células se trataron o no (-) con los complejos GNPs-PEI/ADN durante 24 h, se lavaron con PBS, se les añadió DMEM-FBS fresco y se incubaron durante 48 h (B) Crecientes cantidades del plásmido, comprendidas entre 4 y 14 µg, se conjugaron con 0,5 mg de GNPs-PEI. Las células se trataron como en (A). La relación GNPs-PEI/ADN (p/p) correspondiente está indicada. (C) Células tratadas con complejos que contienen 0,5 mg de GNPs-PEI < 10 nm conjugados a 12 µg del plásmido durante 1-3 días. Como control, 0,5 µl del reactivo comercial LipofectAMINA™/Plus se conjugaron con 245 ng de plásmido pGL4.13. Los resultados se expresan como actividad relativa de luciferasa por µg de proteína. Cada valor representa la media ± DE de tres experimentos independientes.

Finalmente, analizamos la influencia del tiempo de incubación con los complejos NPs/ADN en el proceso de transfección. Se comprobó que la actividad de la proteína luciferasa en células transfectadas con los complejos GNPs-PEI < 10 nm aumentaba progresivamente con el tiempo de incubación (Fig. 17C). Después de tres días de exposición a los complejos GNPs/ADN, los niveles de actividad luciferasa fueron cinco veces superiores a los detectados tras un día de incubación, situándose dentro del mismo rango que el generado por el reactivo LipofectAMINA™/Plus (Fig. 17 C).

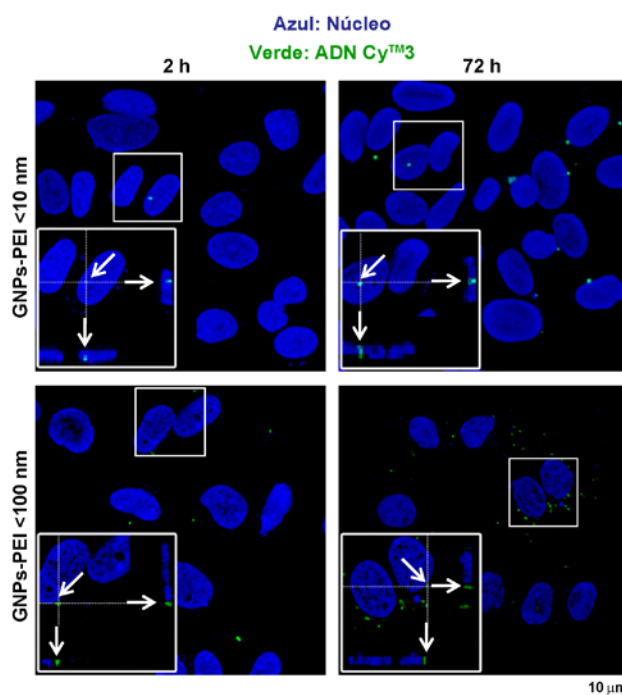
Con el objetivo de confirmar la idoneidad de las condiciones de transfección con las GNPs-PEI  $< 10$  nm, las NPs se conjugaron con el plásmido pDsRed-Monómero-F Hyg que codifica una proteína de fusión fluorescente DsRed-Monómero que se localiza en la cara interna de la membrana plasmática. Las imágenes obtenidas mediante MCLB en células Saos-2 expuestas durante 3 días a los complejos GNPs-PEI  $< 10$  nm/pDsRed-Monómero-F Hyg revelaron la consecución de una transfección eficiente, como indicó la expresión de la proteína fluorescente localizada en la membrana de las células transfectadas, que no mostró discontinuidades en su estructura. Además, la buena organización del citoesqueleto de actina confirmó la ausencia de toxicidad celular (Fig. 18A). Estos ensayos permitieron comparar la eficiencia de transfección de las GNPs-PEI  $< 10$  nm y del reactivo LipofectAMINA<sup>TM</sup>/Plus, calculada como el porcentaje de células que expresan la proteína fluorescente. La eficiencia de transfección obtenida con las GNPs-PEI  $< 10$  nm fue del 15%, muy similar a la del reactivo comercial, que alcanzó valores próximos al 20% (Fig. 18B).



**Figura 18.** Eficiencia de transfección de las GNPs-PEI  $< 10$  nm y el reactivo LipofectAMINA<sup>TM</sup>/Plus. Se conjugaron 12 μg del plásmido pDsRed-Monómero-F Hyg a 0,5 mg de GNPs-PEI  $< 10$  nm y se incubaron con células Saos-2 durante 3 días. Como control, 0,5 μl del reactivo comercial LipofectAMINA<sup>TM</sup>/Plus se conjugaron a 245 ng del plásmido pDsRed-Monómero-F Hyg. (A) La proyección máxima muestra expresión de pDsRed-Monómero (rojo) y actina (verde). (B) Eficiencia de transfección de GNPs-PEI  $< 10$  nm y del reactivo de transfección comercial LipofectAMINA<sup>TM</sup>/Plus, indicada como porcentaje de células que expresan la proteína DsRed-Monómero. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

La conjugación de las GNPs-PEI al plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 permitió determinar la capacidad de los materiales para transportar material genético exógeno al núcleo celular. La señal de moléculas de plásmido, marcado fluorescentemente con

Cy3, se detectó mediante MCLB. Al contrario que lo observado con las GNP-PEI < 100 nm, las GNP-PEI < 10 nm fueron capaces de transportar el plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 al interior del núcleo de células Saos-2. Las moléculas del plásmido pudieron ser detectadas en este orgánulo 2 h después de la adición de los complejos GNP-PEI/ADN < 10 nm, siendo la señal fluorescente detectable tres días después del tratamiento de las células con los complejos (Fig. 19).

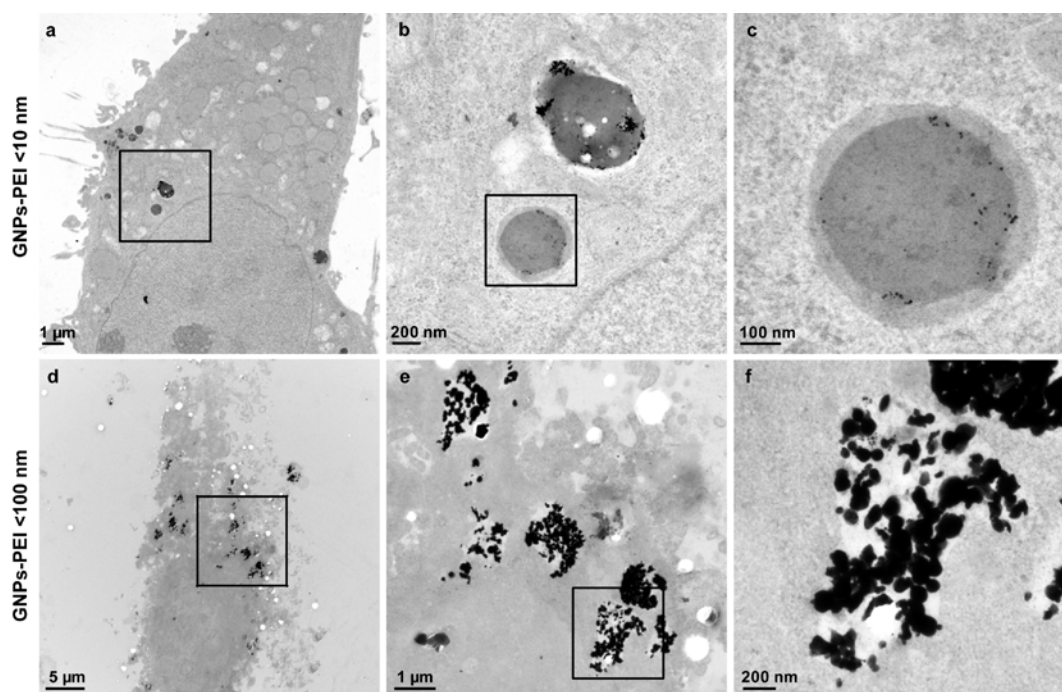


**Figura 19.** Localización nuclear del plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 transferido por las GNP-PEI < 10 y < 100 nm. Las células Saos-2 se incubaron durante 2 y 72 h en presencia de complejos que contienen 0,5 mg de GNP-PEI conjugados a 5,3 μg del plásmido Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 y 6,7 μg del pBluescript. Las proyecciones máximas muestran la localización del plásmido marcado con Cy3 (verde) en núcleos de células Saos-2 teñidos con DAPI (azul). Las cajas muestran una reconstrucción tridimensional realizada mediante el seccionamiento óptico a lo largo del eje x-z (panel inferior) e y-z (panel derecho) de la imagen, ampliada 1,5x.

En resumen, los resultados expuestos demuestran que la funcionalización superficial de las GNP con PEI es fundamental para permitir la adsorción de una cantidad adecuada de moléculas plasmídicas y su internalización en las células estudiadas. Mientras que las GNP-PEI < 100 nm no son capaces de transportar el material genético al núcleo celular, las GNP-PEI < 10 nm actúan eficazmente como agentes de transfección. Así pues, el tamaño de estos materiales es un factor determinante para que actúen como vectores de transferencia génica.

### 2.3 Estudio de los mecanismos de internalización de las GNPs funcionalizadas en células humanas

Las diferencias detectadas en la capacidad de transfección que exhiben las GNPs-PEI en función de su tamaño nos hicieron explorar la posible existencia de mecanismos de internalización diferentes, que determinen su eficacia como vectores de transferencia génica. Para ello se analizó la internalización de las GNPs-PEI  $< 10$  y  $< 100$  nm conjugadas a diferentes plásmidos mediante técnicas de microscopía como MET y MCLB. El análisis de la localización de los complejos GNPs-PEI/pBluescript tras 72 h de incubación con las células, realizado mediante MET, se muestra en la Fig. 20.

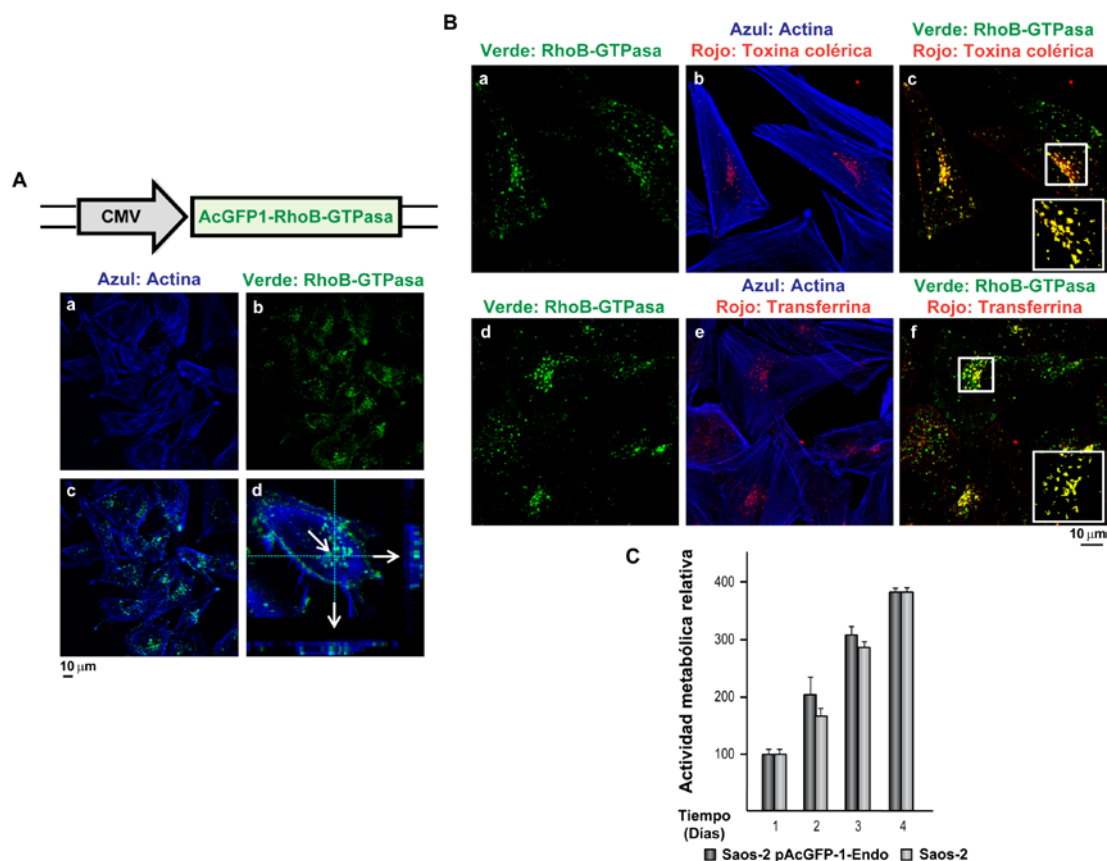


**Figura 20.** Imágenes obtenidas mediante MET de células Saos-2 tratadas con los complejos GNPs-PEI/pBluescript. Las células se incubaron durante 72 h con complejos que contienen 0,5 mg de GNPs-PEI  $< 10$  (a-c) o  $< 100$  nm (d-f) conjugados a 12 µg de plásmido pBluescript. Imágenes ampliadas: (a) 8000x, (b) 50000x, (c) 150000x, (d) 2500x, (e) 15000x y (f) 6000x. (c y f) Detalles de GNPs-PEI  $< 10$  y  $< 100$  nm localizadas en lisosomas y vesículas endocíticas, respectivamente.

En las imágenes obtenidas a menor aumento se observa que, independientemente del tamaño de partícula, las dos especies de GNPs-PEI se detectan en el citoplasma pero no en el interior del núcleo celular. Sin embargo, en función de su tamaño se observaron diferencias en la localización subcelular. Las imágenes tomadas a gran aumento permitieron localizar las GNPs-PEI  $< 10$  nm en el interior de lisosomas, que se

caracterizan por una alta densidad electrónica. Sin embargo, las GNPs-PEI < 100 nm se localizaron en el interior de vesículas intracelulares, probablemente endocíticas, donde aparecían formando grandes aglomerados. Una vez comprobado que ambos tipos de GNPs-PEI eran capaces de acceder al citoplasma celular a través de su inclusión en diferentes orgánulos, se llevó a cabo un estudio de internalización y tráfico intracelular del ADN adsorbido a la superficie de los materiales. Para ello en primer lugar se estableció la línea celular clonal Saos-2-pAcGFP1-Endo. Estas células expresan de forma estable la proteína de fusión fluorescente RhoB-GTPasa/AcGFP1, que se localiza en la superficie de vesículas de la vía endocítica y permiten monitorizar visualmente la progresión de eventos que discurren por esta vía. Una vez establecida la línea celular Saos-2-pAcGFP1-Endo, caracterizamos mediante MCLB la señal de fluorescencia derivada de la expresión estable de la proteína de fusión RhoB-GTPasa/AcGFP1. Se comprobó que la señal emitida se detectaba en pequeñas estructuras vesiculares distribuidas por todo el citoplasma (Fig. 21A). Con el fin de monitorizar rutas de endocitosis mediadas por clatrina o caveolina y asociadas a los endosomas marcados fluorescentemente, las células se incubaron con transferrina y toxina colérica, respectivamente, acopladas al fluorocromo AlexaFluor 594. Los resultados indicaron que la señal de los endosomas en las células Saos-2-pAcGFP1-Endo era específica y colocalizaba con la señal de la transferrina y de la toxina colérica (Fig. 21B), por lo que informa tanto de vesículas recubiertas de clatrina como de caveosomas. Finalmente se comparó la actividad metabólica de las células Saos-2-pAcGFP1-Endo con la de células parentales. Los resultados indicaron que no existe diferencia significativa entre la cinética proliferativa de la línea celular Saos-2-pAcGFP1-Endo y la población parental, descartando un posible desequilibrio en el comportamiento en cultivo de las células modificadas genéticamente (Fig. 21C).

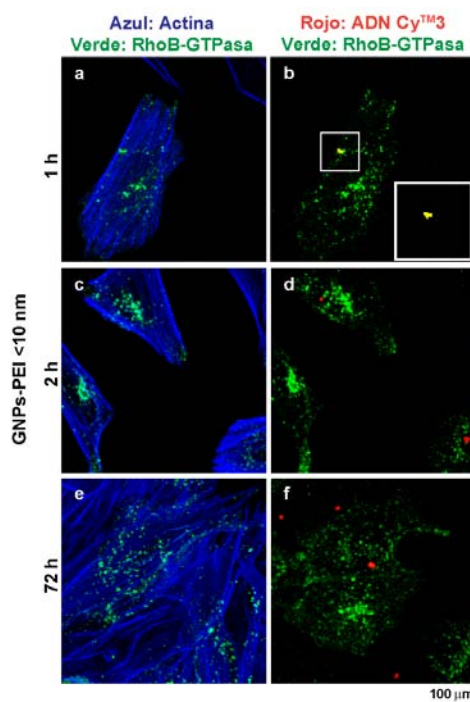




**Figura 21.** Caracterización de la línea celular Saos-2-pAcGFP1-Endo. (A) Representación esquemática del gen de la proteína de fusión fluorescente AcGFP1-RhoB. Las proyecciones máximas muestran: (a) tinción de actina (azul), (b) expresión de RhoB-GTPasa/AcGFP1 (verde), (c) superposición y (d) reconstrucción tridimensional realizada mediante seccionamiento óptico a lo largo del eje x-z (panel inferior) e y-z (panel derecho) de imágenes ampliadas 1,5x. (B) Células Saos-2-pAcGFP1-Endo incubadas en presencia de 10 µg/ml de toxina colérica-AlexaFluor 594 (a-c) o 50 µg/ml de transferrina-AlexaFluor 594 (d-f) durante 1 h. Las proyecciones máximas muestran: (a y d) expresión de RhoB-GTPasa/AcGFP1 (verde), (b y e) tinción de actina (azul) y transferrina o toxina colérica (rojo) y (c y f) superposición. Las cajas muestran los pixeles de colocalización en amarillo, ampliados 2x. (C) Actividad metabólica de células Saos-2-pAcGFP1-Endo y Saos-2 cultivadas durante 1-4 días. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de la fluorescencia determinada en células Saos-2-pAcGFP1-Endo y Saos-2 después de 1 día de cultivo, a los cuales se asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes con resultados similares.

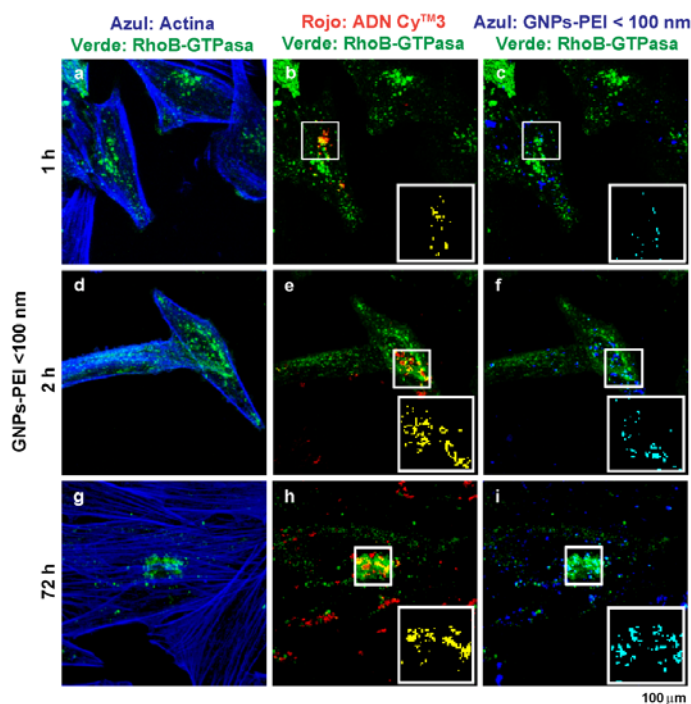
Las células Saos-2-pAcGFP1-Endo se trataron con los complejos GNPs-PEI/Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 durante 1, 2 o 72 h, analizándose mediante MCLB la señal de colocalización del plásmido marcado con el fluorocromo Cy3 y los endosomas (Figs. 22 y 23). Se detectó colocalización tras 1 h de incubación con los complejos GNPs-PEI < 10 nm/Label IT® Cy<sup>TM</sup>3 (Fig. 22), mientras que a partir de las 2 h la señal del fluorocromo Cy3 desapareció de los endosomas, indicando que el ADN se ha liberado de estos orgánulos.





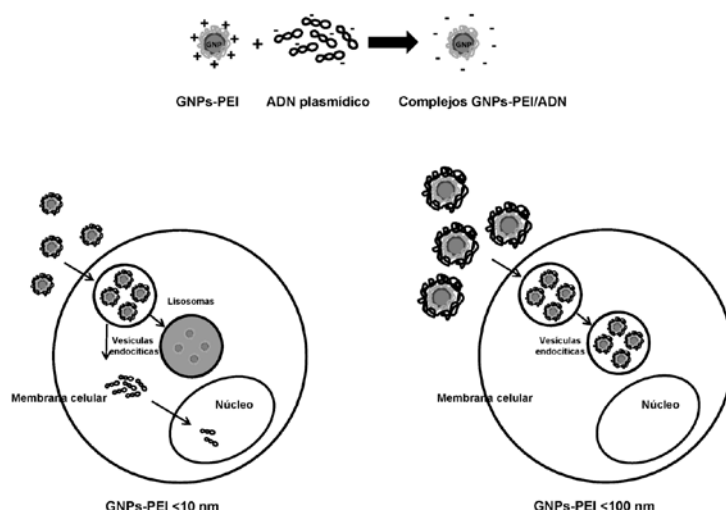
**Figura 22.** Localización endosomal del plásmido Label IT® Cy™3 conjugado a las GNPs-PEI < 10 nm. Las células Saos-2-pAcGFP-1-Endo se incubaron durante 1, 2 y 72 h en presencia de complejos que contienen 0,5 mg de GNPs-PEI conjugados a 5,3  $\mu$ g del plásmido Label IT® Cy™3 y 6,7  $\mu$ g del pBluescript. Las proyecciones máximas muestran: (a, c y e) expresión de RhoB-GTPasa/AcGFP1 (verde) y tinción de actina (azul); (b, d y f) expresión de RhoB-GTPasa/AcGFP1 (verde) y plásmido Label IT® Cy™3 (rojo). Las cajas muestran los pixeles de colocalización en amarillo, ampliados 2x (b).

Por el contrario, la señal del plásmido conjugado a las GNPs-PEI < 100 nm colocalizó con la señal de los endosomas desde la primera hora de incubación y su presencia en estos orgánulos siguió siendo detectable 3 días después (Fig. 23, b, e, h). El tamaño de los complejos generados con las GNPs-PEI < 100 nm permitió detectar las partículas mediante reflexión, observándose su colocalización con endosomas marcados (Fig. 23, c, f, i), lo que concuerda con los datos obtenidos mediante MET. Tomados en conjunto, los resultados indican que los complejos GNPs-PEI < 100 nm/ADN quedan secuestrados en el interior de vesículas endocíticas lo que imposibilita el transporte y entrega del plásmido al núcleo celular.



**Figura 23.** Localización endosomal del plásmido Label IT® Cy™3 conjugado a las GNPs-PEI < 100 nm. Las células Saos-2-pAcGFP-1-Endo se incubaron durante 1, 2 y 72 h en presencia de complejos que contienen 0,5 mg de GNPs-PEI conjugados a 5,3 μg del plásmido Label IT® Cy™3 y 6,7 μg del pBluescript. Las proyecciones máximas muestran: (a, d y g) expresión de RhoB-GTPase/AcGFP1 (verde) y tinción de actina (azul); (b, e y h) expresión de RhoB-GTPase/AcGFP1 (verde) y plásmido Label IT® Cy™3 (rojo) o (c, f e i) GNPs-PEI < 100 nm detectadas por reflexión (azul). Las cajas muestran los pixeles de colocalización (b, e y h) en amarillo y (c, f y i) en cian, ampliados 2x.

El esquema de la Fig. 24 ilustra el comportamiento de las GNPs-PEI estudiadas con respecto al tráfico celular y su capacidad de entrega al núcleo del material genético.

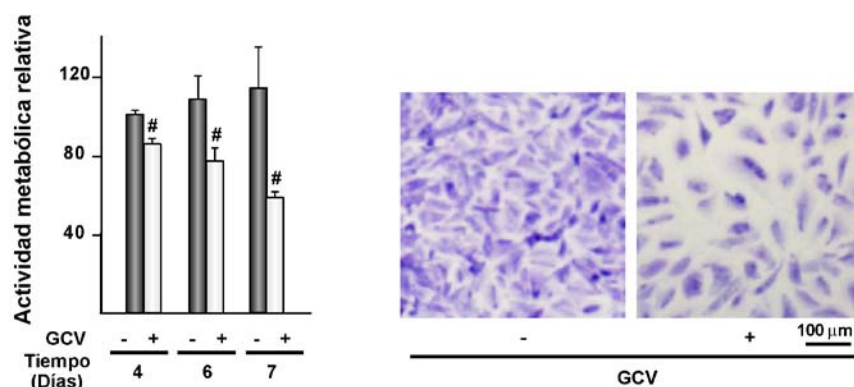


**Figura 24.** Representación esquemática de la estructura de los complejos GNPs-PEI/ADN y su comportamiento con respecto al tráfico intracelular.

## 2.4 Inducción de la expresión del gen terapéutico HSV1tk mediante transfección con las GNPs funcionalizadas

Una vez demostrado que las GNPs-PEI < 10 nm transfectan genes testigo, se consideró de interés explorar su capacidad para transfectar genes con actividad terapéutica, como el gen suicida HSV1tk que codifica la proteína quinasa del virus herpes simple tipo 1 (HSV1tk). Enzimas como HSV1tk, que no se expresan en mamíferos, son capaces de convertir moléculas no tóxicas, como el análogo de nucleósido GCV, en agentes con actividad quimioterapéutica (Fillat y col., 2003). La fosforilación de GCV por HSV1tk convierte a la prodroga en un agente citotóxico activo en las células tratadas que expresan la proteína. Tras su fosforilación, el GCV se incorpora a las hebras de ADN durante la replicación, actuando como inhibidor de la síntesis de ADN, lo que conduce finalmente a la muerte celular por apoptosis (Robe y col., 2000; Craperi y col., 1999). Esta citotoxicidad es extensible a células vecinas que no han recibido el vector que alberga el gen HSV1tk pero internalizan el GCV fosforilado, fenómeno denominado “efecto de proximidad” (del inglés, *bystander effect*). Este es uno de los mecanismos de potenciación del efecto citotóxico más explotados en terapia génica antitumoral experimental (Langford y col., 2009; van Putten y col., 2010).

La expresión de la proteína HSV1tk en células incubadas con los complejos GNPs-PEI < 10 nm/pORF-HSV1tk, fue capaz de catalizar la conversión de GCV en su derivado citotóxico, lo que tras 7 días de incubación con la prodroga provocó la reducción de la viabilidad celular en un 50% en comparación con cultivos expuestos a los complejos pero no a GCV (Fig. 25).



**Figura 25.** Citotoxicidad inducida por los complejos GNPs-PEI < 10 nm/pORF-HSV1tk tras tratamiento con GCV. Izquierda: Actividad metabólica de células Saos-2 tratadas durante 48 h con complejos que contienen 0,5 mg de GNPs-PEI < 10 nm conjugados a 12 μg del plásmido pORF-HSV1tk, y posteriormente incubadas en presencia (+) o no (-) de 10 μg/ml de GCV durante 4-7 días. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de fluorescencia determinado en células no tratadas después de 4 días de cultivo, al cual se asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media ± DE de tres experimentos independientes. #p < 0,05 respecto a células tratadas con los complejos GNPs-PEI < 10 nm/pORF-HSV1tk en ausencia de GCV. Derecha: microfotografías ópticas de células Saos-2 tratadas con los complejos GNPs-PEI < 10 nm/pORF-HSV1tk y cultivadas durante 7 días en presencia (+) o ausencia (-) de 10 μg/ml de GCV.

En resumen, estos resultados indican que las GNPs-PEI < 10 nm son capaces de actuar como vectores de transfección eficientes y sugieren que podrían ser empleadas en terapias génicas antitumorales experimentales.

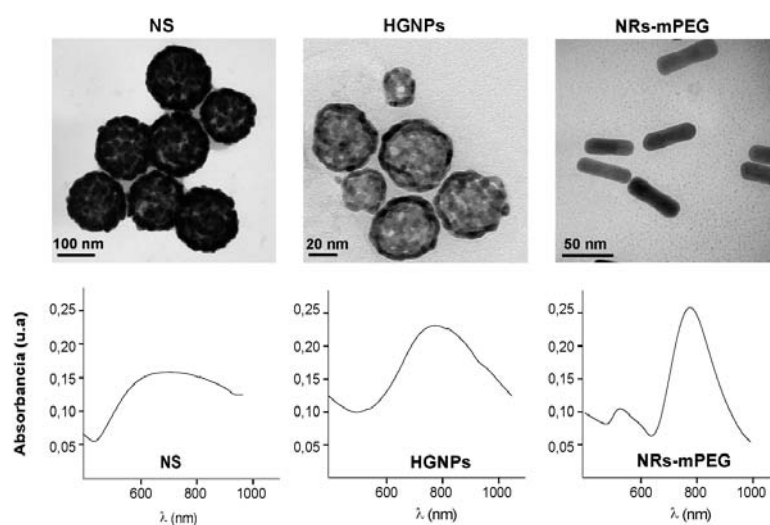
### 3. CAPACIDAD DE NIR-NPs BASADAS EN ORO PARA GENERAR HIPERTERMIA ÓPTICA EN CÉLULAS HUMANAS

En este apartado se evaluó la capacidad de tres tipos de NIR-NPs basadas en oro: NS, HGNNs y NRs-mPEG, para incrementar la temperatura de cultivos celulares a través de la generación de hipertermia óptica subletal y regular la expresión de genes controlados por el promotor del gen humano termosensible *HSP70B*. Asimismo se estudió la capacidad de estos materiales para desencadenar mecanismos de muerte celular tras la generación de hipertermia óptica letal.

#### 3.1 Caracterización de las NIR-NPs

La caracterización morfológica de las NS, HGNNs y los NRs-mPEG se realizó mediante MET (Fig. 26, paneles superiores). Las NS presentaron un núcleo de sílice densa, de baja densidad electrónica, recubierto con una carcasa de oro caracterizada por

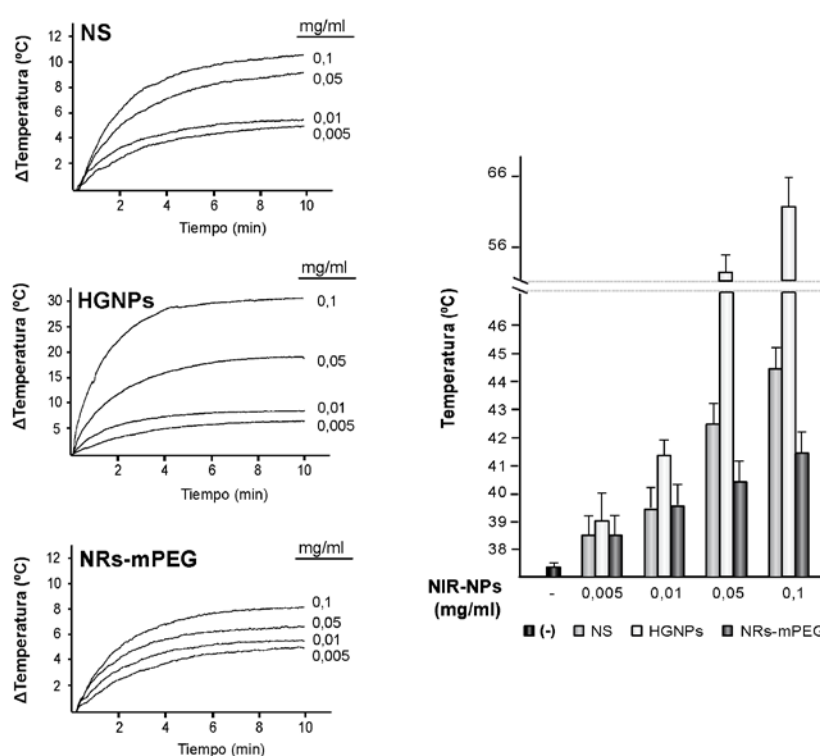
una alta densidad electrónica. Las NS poseen un diámetro medio de 180 nm con carcasas de oro de aproximadamente 15 nm de espesor, mientras que las HGNPs presentan un diámetro promedio de 36 nm y un espesor de la cubierta de oro de unos 8 nm que da paso a un interior completamente hueco. Los NRs-mPEG, macizos, presentan una longitud en torno a los 50 nm y una anchura de 12 nm. A la vista de las imágenes, cabe destacar la elevada homogeneidad de la distribución del tamaño de partícula de las NIR-NPs. Por otro lado se confirmó que las NIR-NPs eran capaces de absorber luz en la región NIR. Los espectros de absorción UV-VIS-NIR de las NS dispersas en agua mostraron valores máximos en una amplia banda extendida en el rango de 600 a 900 nm, mientras que las HGNPs presentaron un pico de absorción más estrecho, situado en torno a los 780 nm. A diferencia de las NS y HGNPs, los NRs-mPEG mostraron 2 bandas de absorción, la característica banda transversal de plasmón localizada en la región visible en torno a los 520 nm y la banda longitudinal de plasmón centrada en la región NIR, aproximadamente a 800 nm (Fig. 26, paneles inferiores).



**Figura 26.** Caracterización de las NIR-NPs. Panel superior: morfología de NS, HGNPs y NRs-mPEG observada mediante MET. Panel inferior: espectro de absorción UV-VIS-NIR de las NIR-NPs.

A continuación se comparó la eficiencia fototérmica de las tres especies de materiales. Para ello se registraron los perfiles de incremento de temperatura provocados por las NS, HGNPs o los NRs-mPEG dispersos en DMEM-FBS tras su exposición a radiación NIR durante 10 min. Se observó que el calor disipado por las NIR-NPs aumentaba la temperatura del medio de cultivo de manera dosis-dependiente

(Fig. 27). Tras la irradiación de las dispersiones de NS, HGNPs o NRs-mPEG a una concentración de 0,1 mg/ml se registraron valores máximos de temperatura de  $44,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ ,  $61,7 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$  y  $41,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. En principio, estos resultados sugieren que las HGNPs son más eficaces que las NS y los NRs-mPEG en la conversión de la energía de la luz NIR absorbida en calor. Este efecto se podría atribuir a la geometría de las HGNPs (Kessentini y col., 2012), ya que la masa de oro de estas partículas es menor que la de las NS y los NRs-mPEG (datos no mostrados). La exposición de DMEM-FBS al láser NIR mantuvo los niveles de temperatura aproximadamente a  $37^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 27.** Comportamiento fototérmico de las NIR-NPs. Las gráficas muestran los incrementos de temperatura en función del tiempo (izquierda) y el valor máximo de temperatura (derecha) de dispersiones de DMEM-FBS que contienen las concentraciones indicadas de NS, HGNPs y NRs-mPEG, tras su exposición a láser NIR a  $2 \text{ W/cm}^2$  durante 10 min. Los valores máximos de temperatura se expresan como media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes

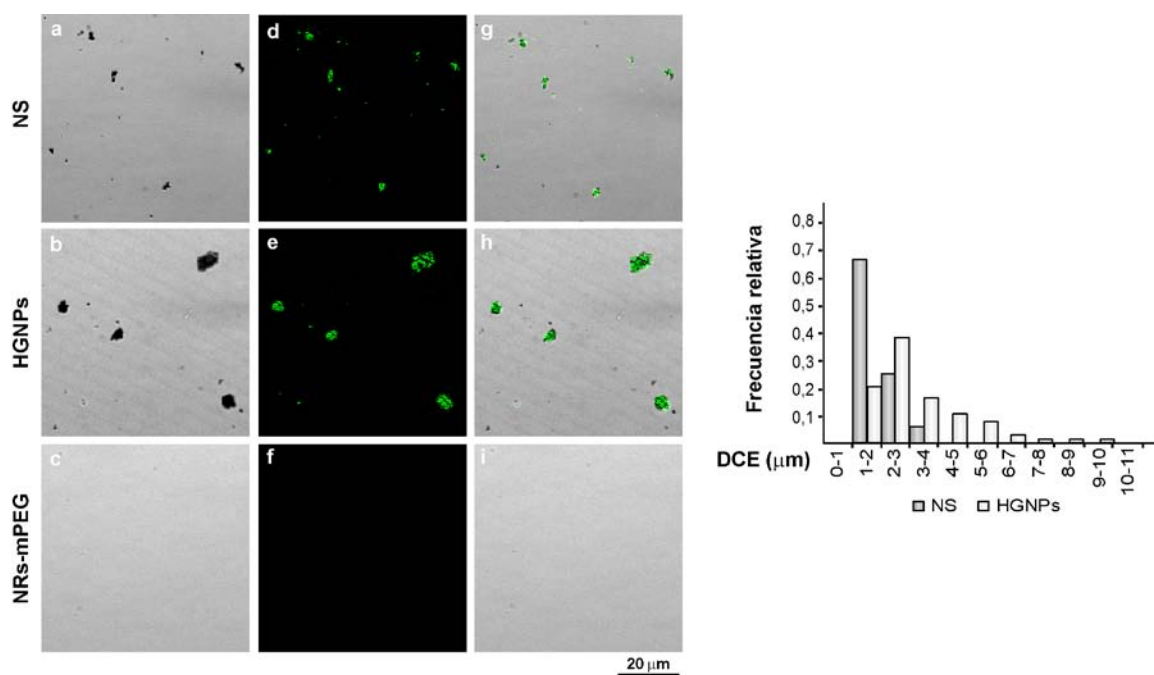
Las NIR-NPs mostraron unos valores de potencial zeta negativos en agua desionizada,  $-1,9 \text{ mV}$  para las NS y HGNPs y  $-2,6 \text{ mV}$  para los NRs-mPEG, que disminuyeron levemente cuando las dispersiones se prepararon en DMEM-FBS, obteniéndose unos valores de  $-2,4 \text{ mV}$ ,  $-2,1 \text{ mV}$  y  $-4,6 \text{ mV}$  para las NS, HGNPs y NRs-mPEG, respectivamente (Tabla 5). Estos potenciales electrocinéticos no son

suficientes para generar fuerzas de repulsión que garanticen una buena dispersión de las NPs, generalmente obtenida a partir de valores de  $\pm 30$  mV, por lo que favorecen su aglomeración.

	Potencial Zeta (mV)	
	H <sub>2</sub> O	DMEM-FBS
NS	-1,9	-2,4
HGNPs	-1,9	-2,1
NRs-mPEG	-2,6	-4,6

**Tabla 5.** Cuantificaciones de potencial zeta de las NIR-NPs. Los datos mostrados en la tabla representan la media de tres determinaciones independientes para cada NIR-NPs.

A continuación se evaluó el estado de aglomeración de las NIR-NPs dispersas en DMEM-FBS. Este estudio no se pudo llevar a cabo mediante PCS, debido a que las NPs basadas en oro absorben en la zona del espectro situada entre 600 y 1000 nm, interfiriendo con el láser de 633 nm que se emplea para realizar esta determinación, lo que da lugar a valoraciones erróneas. Por ello, las dispersiones se analizaron mediante MCLB. Las imágenes que se muestran en la Fig. 28 revelaron una gran heterogeneidad en el tamaño de los aglomerados de NS y HGNPs detectados al superponer las imágenes de MCLB obtenidas mediante luz transmitida y reflexión. Los NRs-mPEG no se detectaron por reflexión, sugiriendo un bajo estado de aglomeración de estos materiales cuyo tamaño no superaba el límite de resolución del microscopio confocal (258 nm en el plano xy). A partir de las imágenes obtenidas se determinó la distribución del tamaño de los aglomerados de NS y HGNPs. La distribución de los valores de DCE de los aglomerados de NS indicó que el 70% de la población mostraba diámetros medios en torno a 1-2  $\mu\text{m}$ . Por el contrario, la mayoría de las HGNPs presentó valores de DCE  $> 2$   $\mu\text{m}$  y una distribución de tamaño mucho más amplia, pudiéndose detectar poblaciones de hasta 9-10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 28.** Estado de aglomeración de las NIR-NPs en medio acuoso. Panel izquierdo: imágenes obtenidas por MCLB de suspensiones de 0,01 mg/ml de NS, HGNPs y NRs-mPEG en DMEM-FBS. Se muestran las imágenes obtenidas mediante: (a, b, c) luz transmitida, (d, e, f) reflexión y (g, h, i) su superposición. Panel derecho: el histograma muestra la distribución de los valores de DCEs de los aglomerados de NS y HGNPs en DMEM-FBS.

### 3.2 Estudio de los mecanismos de internalización de las NIR-NPs en células humanas

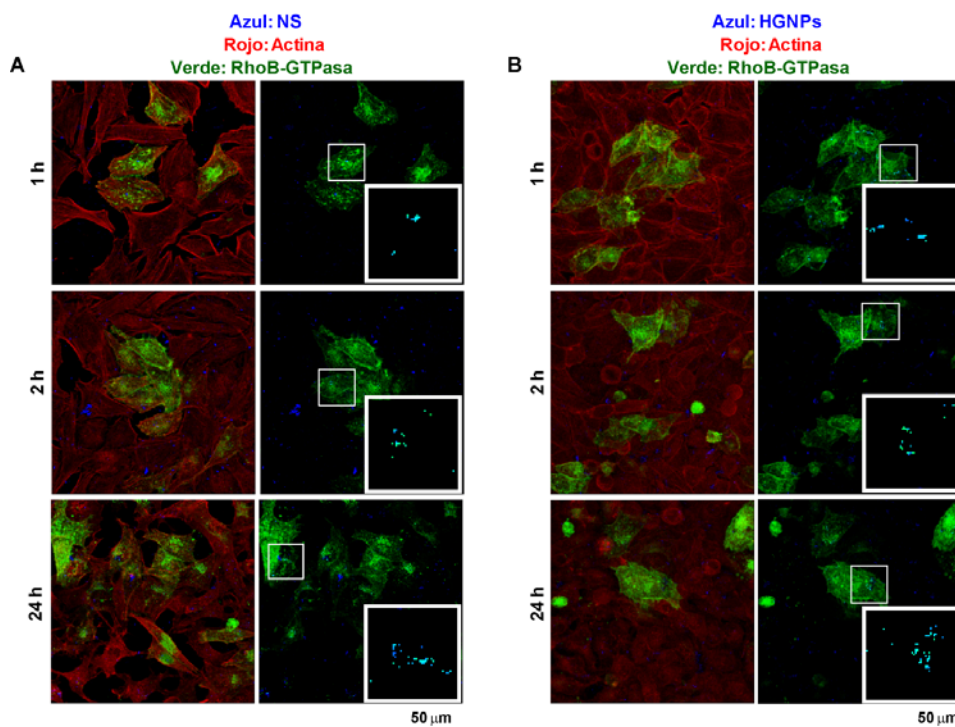
La internalización de las NIR-NPs y su conformación en el interior celular son factores que influyen en el establecimiento de una eficiente hipertermia óptica en el microambiente celular. Debido a esto, se estudiaron mediante MCLB las posibles vías de entrada de NIR-NPs, así como su estado de agregación intracelular.

La distribución del tamaño de partícula de los aglomerados internalizados por células HeLa tras su exposición a 0,1 mg/ml de NS o HGNPs durante 24 h se determinó a partir de las imágenes obtenidas mediante reflexión. Los diámetros medios de los aglomerados de NS y HGNPs detectados fueron de  $1,15 \pm 0,10 \mu\text{m}$  y  $0,77 \pm 0,04 \mu\text{m}$ , respectivamente. Estos resultados sugieren la presencia de aglomerados intracelulares de ambos tipos de NPs, siendo de mayor tamaño en el caso de las NS. Se contabilizaron unos  $5,56 \pm 1,88$  aglomerados de NS por célula y  $1,02 \pm 0,48$  de HGNPs. Al igual que lo observado en las dispersiones, los NRs-mPEG no pudieron ser detectados mediante MCLB en el interior celular debido probablemente a su ineficiente internalización o a que en este entorno su tamaño se sitúa por debajo del límite de resolución del



microscopio confocal. La cuantificación de la masa de oro localizada en la monocapa celular mediante espectrometría de masas reveló que la cantidad de oro en  $3 \times 10^4$  células tratadas con 0,05 mg/ml de NS y HGNPs fue de  $14,7 \pm 1,6 \mu\text{g}$  y  $2,5 \pm 0,8 \mu\text{g}$ , respectivamente.

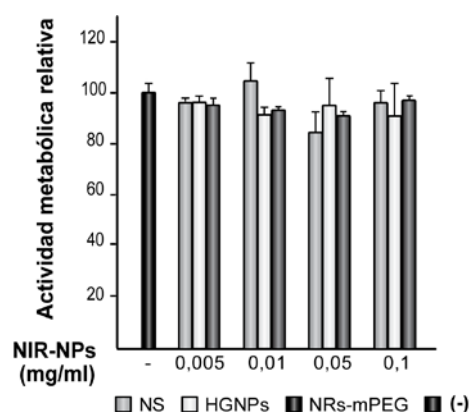
El estudio del tráfico intracelular de las NIR-NPs se llevó a cabo en células HeLa transfectadas transitoriamente con pAcGFP-1-Endo. Las células transfectadas expresan la proteína de fusión RhoB-GTPasa/AcGFP1 fluorescente que se localiza en la superficie de las vesículas de la vía endocítica, como ya se ha descrito. Tras la transfección, las células se trataron con las NS o las HGNPs durante 1, 2 y 24 h. La señal de emisión de ambas NIR-NPs colocalizó con la señal de la endosomas marcados tras 1 h de incubación con los cultivos celulares, siendo los materiales detectables en este compartimento subcelular 24 h después del tratamiento (Fig. 29).



**Figura 29.** Localización endosomal de las NS y HGNPs. Células HeLa transfectadas con 320 ng del plásmido pAcGFP-1-Endo conjugados a 0,5  $\mu\text{l}$  del reactivo comercial LipofectAMINA<sup>TM</sup> 2000 se incubaron durante 1, 2 o 24 h en presencia de 0,01 mg/ml de NS (A) o HGNPs (B). Las proyecciones máximas muestran: expresión de RhoB-GTPasa/AcGFP1 (verde), tinción de actina (rojo) y NS (A) o HGNPs (B) (azul) detectadas por reflexión. Las cajas muestran los píxeles de colocalización de RhoB-GTPasa/AcGFP1 y las NIR-NPs en cian, ampliados 4x.

### 3.3 Evaluación de la capacidad de las NIR-NPs para dirigir tratamientos fototérmicos en células humanas

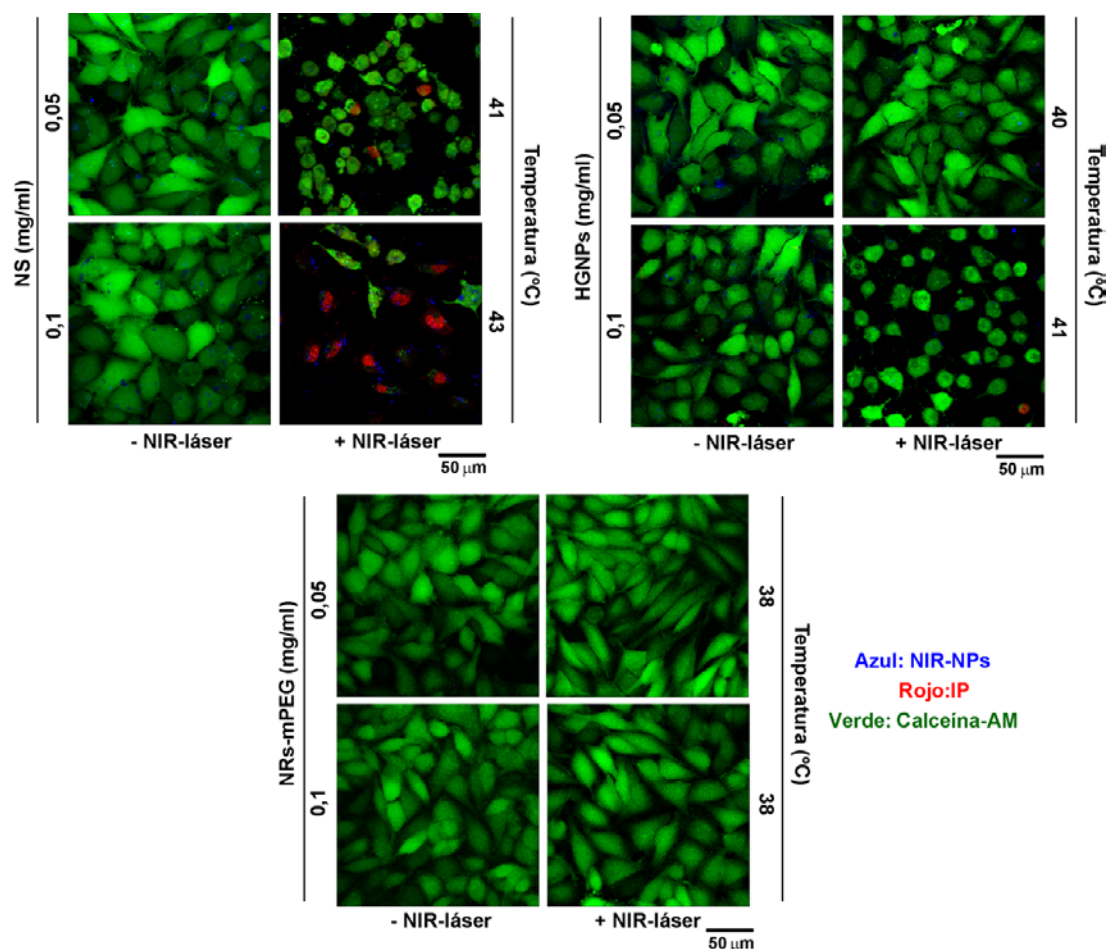
En primer lugar se evaluó la citocompatibilidad de las NIR-NPs en cultivos de células HeLa tratados durante 48 h a dosis que oscilaron entre 0,005 y 0,1 mg/ml, determinándose la actividad metabólica empleando el reactivo alamar Blue. La actividad metabólica no se vio afectada significativamente durante el período de observación, a ninguna de las dosis ensayadas (Fig. 30).



**Figura 30.** Influencia de las NIR-NPs sobre la viabilidad celular. Las células se trataron o no (-) con las dosis indicadas de NS, HGPNs o NRs-mPEG durante 48 h. Los resultados se expresan como porcentaje de fluorescencia determinado en células no tratadas, al cual se le asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

A continuación se determinó la influencia de la irradiación NIR en la viabilidad celular. Con el fin de analizar el efecto del material internalizado por las células, tras 24 h de exposición a las NIR-NPs los cultivos se lavaron con PBS, se expusieron al láser durante los tiempos indicados y a continuación se incubaron en DMEM-FBS durante otras 24 h. Para evaluar la viabilidad de células HeLa incubadas en presencia de las NIR-NPs se emplearon los indicadores fluorescentes calceína-AM e IP. La calceína en su forma acetometil éster (AM) es permeable a la membrana celular y no emite fluorescencia debido al efecto de apantallamiento de la señal que provoca el grupo AM. Tras acceder al citoplasma celular los grupos éster del compuesto son hidrolizadas por las esterasas celulares dando lugar a su forma fluorescente, calceína. El IP es un compuesto fluorescente capaz de intercalarse en la doble cadena de ADN y es impermeable a la membrana celular, no pudiendo acceder al interior de células viables. Así, la doble incubación con calceína-AM e IP permite la identificación de células vivas

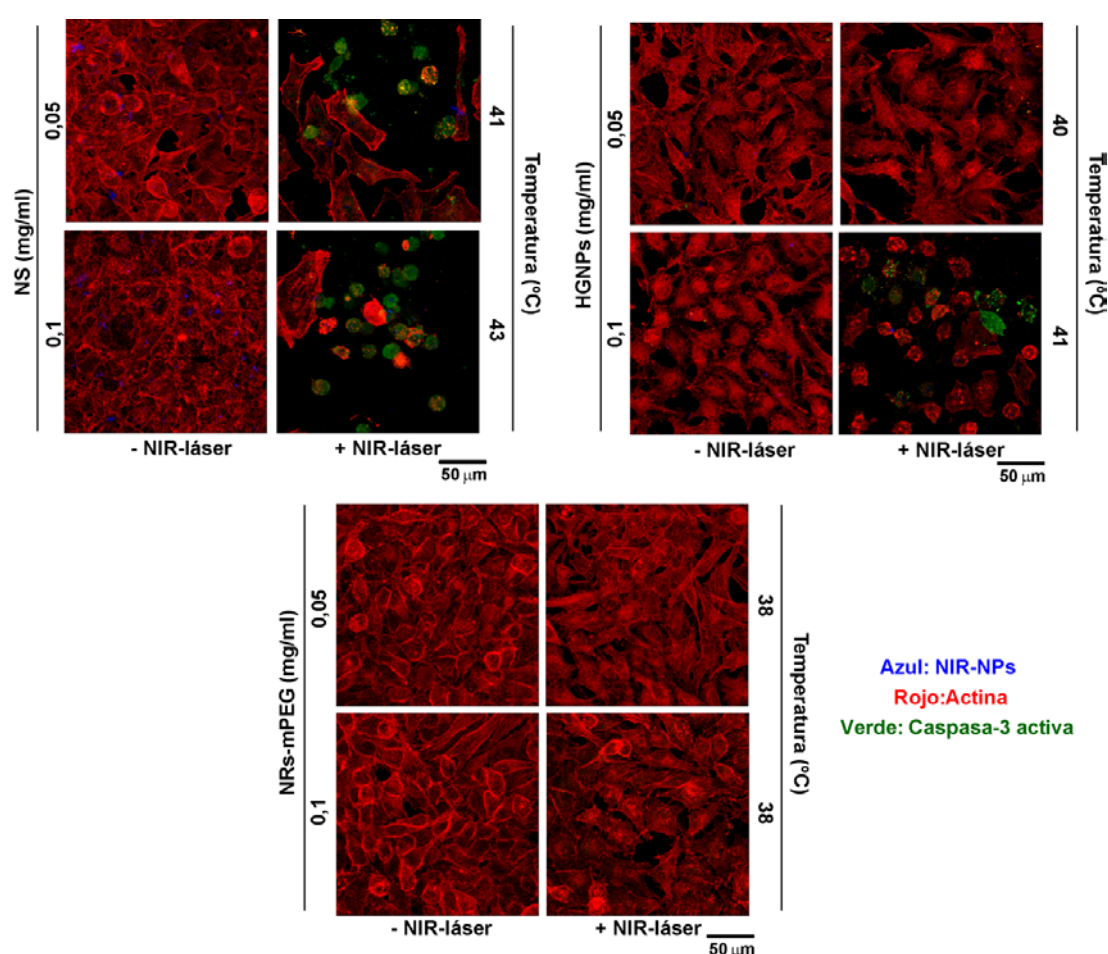
y muertas. En concordancia con los datos obtenidos empleando el reactivo alamarBlue, la incubación con calceína-AM de cultivos tratados con NPs y no expuestos a irradiación con láser NIR reveló una tinción homogénea de calceína y una ausencia de tinción inducida por IP, indicando que estas células no presentaban daño en su membrana celular (Fig. 31). Sin embargo, la exposición de cultivos tratados con las NIR-NPs a láser NIR repercutió de manera significativa en la viabilidad celular, efecto que mostró una clara dependencia con la dosis y el tipo de material empleado. El tratamiento fototérmico dirigido por las NS a una concentración de 0,05 mg/ml resultó en un descenso notable en la viabilidad de los cultivos celulares estudiados, mientras que el tratamiento con las HGNPs y los NRs-mPEG a esta concentración no tuvo consecuencias detectables sobre la viabilidad celular (Fig. 31). La incubación con IP de los cultivos tratados con las NS e irradiados con láser NIR tiñó los ácidos nucleicos, indicando la pérdida de integridad de la membrana plasmática. El número de células positivas para la tinción con IP aumentó en cultivos irradiados con láser NIR e incubados en presencia de 0,1 mg/ml de NS. Sin embargo, en cultivos tratados con 0,1 mg/ml de HGNPs y expuestos a irradiación NIR se detectó un bajo porcentaje de células permeables a IP, aunque se observó una generalizada retracción del citoplasma celular (Fig. 31), signo relacionado con el daño celular. Por el contrario, el tratamiento con los NRs-mPEG a una concentración de 0,1 mg/ml no alteró la viabilidad celular.



**Figura 31.** Influencia de las NIR-NPs sobre la viabilidad celular tras irradiación con láser NIR. Tinción con calceína-AM (verde) e IP (rojo) de células HeLa tratadas durante 24 h con las dosis indicadas de NS, HGNNPs o NRs-mPEG, expuestas (+) o no (-) a láser NIR a  $2 \text{ W/cm}^2$  durante 30 min y posteriormente cultivadas durante 24 h. NS y HGNNPs (azul) se detectaron por reflexión. Los datos de temperatura en cultivos irradiados se obtuvieron empleando un termopar. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares.

A continuación quisimos investigar si las células tratadas con las NIR-NPs y expuestas a láser NIR expresaban la forma activa de la caspasa-3, uno de los principales ejecutores de la apoptosis en células somáticas (Thornberry y Lazebnik, 1998; Porter y Jänicke, 1999). Como se observa en la Fig. 32, no se observó la aparición de células positivas para caspasa-3 activa tras el tratamiento de los cultivos con concentraciones crecientes de las NIR-NPs en ausencia de irradiación NIR. Sin embargo, tras la exposición a láser NIR de cultivos tratados con 0,05 mg/ml de NS, un alto porcentaje de células manifestaron un elevado nivel de desorganización del citoesqueleto así como la aparición de caspasa-3 activa en sus citoplasmas, efectos que se magnificaron cuando la dosis de las NS se incrementó a 0,1 mg/ml. Por el contrario, dosis de 0,05 mg/ml de HGNNPs o NRs-mPEG no fueron capaces de desencadenar un efecto semejante tras el

tratamiento de los cultivos con el láser NIR (Fig. 32). La inducción fototérmica de las HGNPs o los NRs-mPEG a dosis de 0,05 mg/ml no dio lugar a la aparición de células positivas para caspasa-3 activa, aunque las HGNPs, a diferencia de los NRs-mPEG, generaron un ligero grado de desorganización del citoesqueleto de células irradiadas. La ejecución de ensayos paralelos con dosis de 0,1 mg/ml permitió observar la aparición de células positivas para caspasa-3 activa y una clara desorganización del citoesqueleto cuando el agente inductor fueron las HGNPs. Sin embargo, el aumento de la concentración de NRs-mPEG y posterior tratamiento con láser NIR no tuvo consecuencias significativas a nivel de la morfología celular o activación de caspasa-3.



**Figura 32.** Detección de la forma activa de la caspasa-3 en células tratadas con las NIR-NPs y expuestas a láser NIR. Tinción de la forma activa de la caspasa-3 (verde) y actina (rojo) en células HeLa tratadas durante 24 h con las dosis indicadas de NS, HGNPs o NRs-mPEG, expuestas (+) o no (-) a láser NIR a 2 W/cm<sup>2</sup> durante 30 min y posteriormente cultivadas durante 24 h. NS y HGNPs (azul) se detectaron por reflexión. Los datos de temperatura en cultivos irradiados se obtuvieron empleando un termopar. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares.

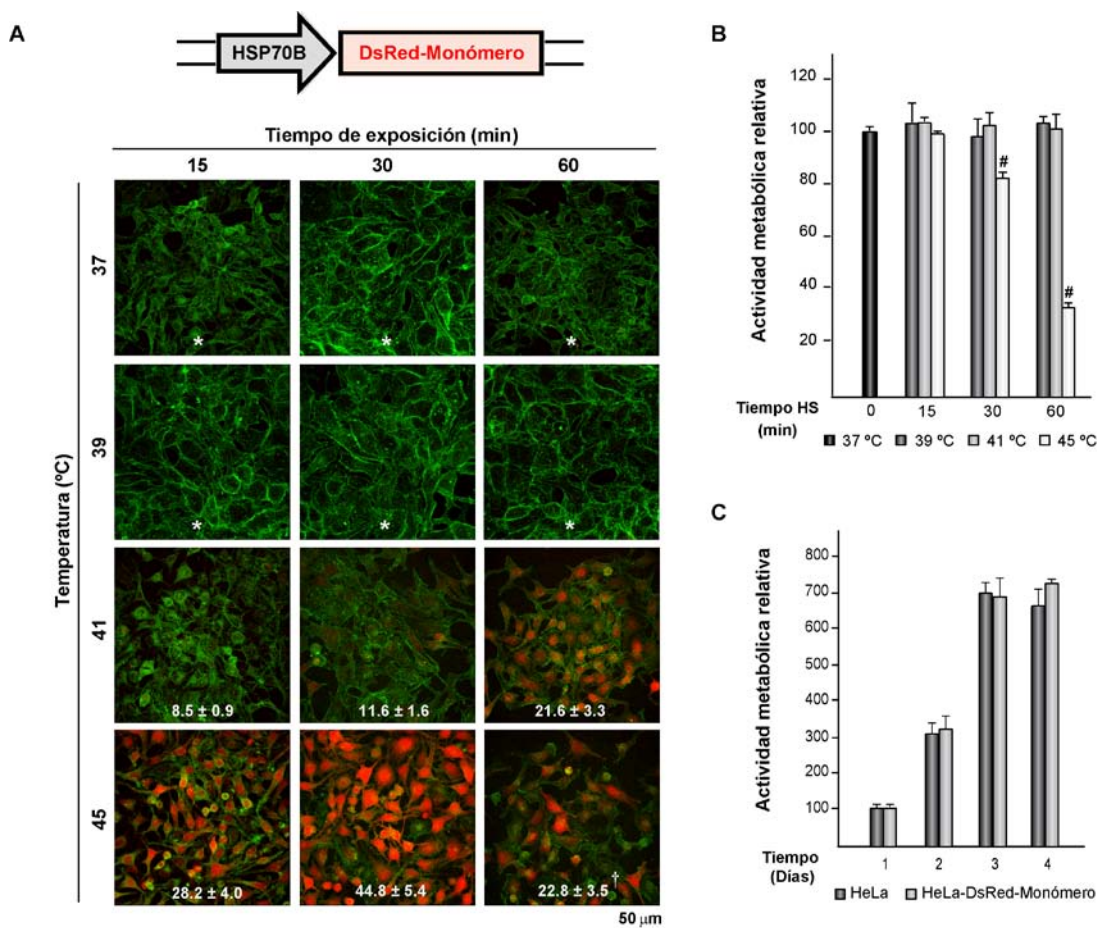
Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la eficiencia de las NS para inducir muerte celular mediante inducción de hipertermia óptica es mayor que la mostrada por las HGNPs o los NRs-mPEG. Asimismo los resultados obtenidos tras el tratamiento con los NRs-mPEG sugieren que este tipo de material posee una baja capacidad de internalización en células HeLa, lo que a las dosis ensayadas dificulta alcanzar un nivel de hipertermia suficiente para desencadenar mecanismos de muerte celular.

### **3.4 Inducción de expresión transgénica mediante tratamiento fototérmico mediado por NIR-NPs**

A continuación se evaluó la capacidad de las NIR-NPs para generar hipertermias subletales que puedan inducir la expresión de genes de interés. Para ello, en primer lugar se estableció una línea clonal derivada de células HeLa que denominamos HeLa-DsRed-Monómero. Este clon informa de la intensidad del estrés térmico generado mediante el control que ejerce el promotor del gen humano termosensible *HSP70B* sobre la expresión de la proteína fluorescente pDsRed-Monómero. En la Fig. 33A se muestra el comportamiento de la línea celular tras ser sometida a tratamientos térmicos en un baño termostatzado, que variaron en su intensidad y duración. En células incubadas a 37°C no se detectó expresión de la proteína fluorescente. Se observó que el tratamiento térmico a 39°C no altera los niveles basales de expresión, ni siquiera cuando se prolonga hasta 60 min. Por el contrario, un estrés térmico a 41°C durante 15 min es suficiente para inducir la expresión de la proteína DsRed-Monómero. Se observó que los niveles de fluorescencia aumentaban de forma dependiente a la duración de la estimulación térmica. El tratamiento a 45°C durante 15 y 30 min provocó un aumento significativo de la expresión del gen testigo en comparación a la detectada tras elevar la temperatura a 41°C durante periodos idénticos. Sin embargo, cuando el tratamiento a 45°C se prolongaba hasta los 60 min se detectó una disminución notable de la intensidad de fluorescencia. Este efecto es atribuible al descenso de la viabilidad celular consecuencia de la estimulación térmica de alta intensidad, que fue detectable a partir de los 30 min de duración del tratamiento hipertérmico (Fig. 33B). Por último, se comparó la capacidad proliferativa de las células HeLa-DsRed-Monómero con las de células parentales HeLa mediante ensayos de actividad metabólica empleando el reactivo alamarBlue. Los resultados indicaron que no existe diferencia significativa entre las tasas de proliferación de la línea celular HeLa-DsRed-Monómero y la población



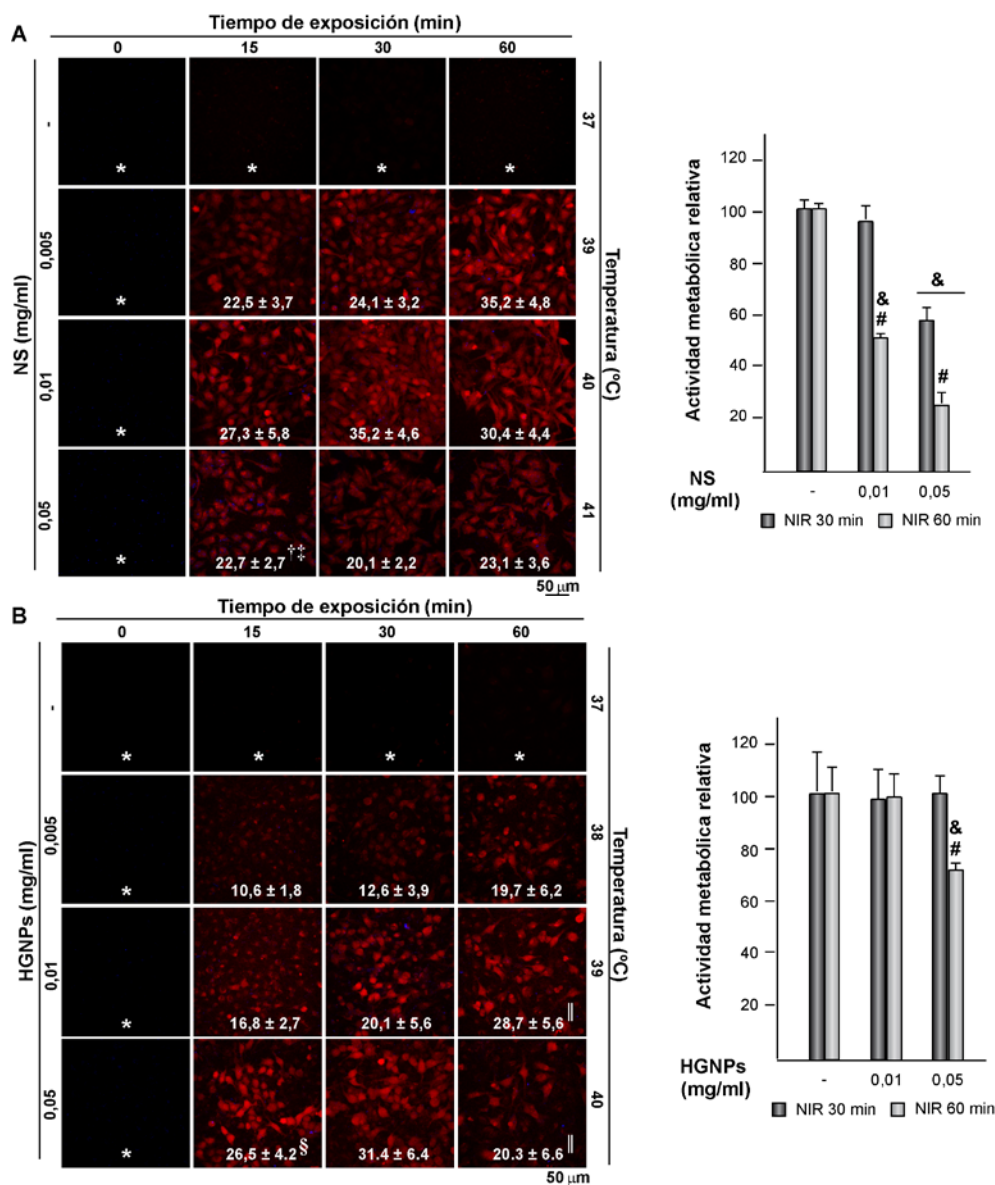
parental, descartando un posible desequilibrio en el comportamiento en cultivo de las células modificadas genéticamente (Fig. 33C). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la línea celular HeLa-DsRed-Monómero actúa como un sensor térmico eficaz, capaz de informar de aumentos de temperatura en el microambiente celular.



**Figura 33.** Caracterización de la línea celular HeLa-DsRed-Monómero. Las células HeLa-DsRed-Monómero se sometieron a tratamientos térmicos a 39°C, 41°C o 45°C durante 15-60 min y a continuación se cultivaron a 37°C durante 24 h. (A) Representación esquemática del gen de la proteína fluorescente DsRed-Monómero. Las proyecciones máximas muestran: expresión de DsRed-Monómero (rojo) y tinción de actina (verde). Se indican los valores medios de intensidad de fluorescencia  $\pm$  DE. \* = No se detectó fluorescencia. Las diferencias en las intensidades de fluorescencia entre cultivos tratados con diferentes temperaturas y tiempos de exposición fueron significativas ( $p < 0,05$ ) excepto en la siguiente condición: †  $p > 0,05$  respecto a células sometidas a choque térmico a 41°C durante 60 min. (B) Actividad metabólica de células HeLa-DsRed-Monómero 24 h después de los tratamientos térmicos (HS) a los tiempos indicados. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de la fluorescencia determinada en células HeLa-DsRed-Monómero cultivadas a 37°C, a la cual se le asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. #  $p < 0,05$  respecto a células cultivadas a 37°C. (C) Actividad metabólica de células HeLa y HeLa-DsRed-Monómero cultivadas durante 1-4 días. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de la fluorescencia determinada en células HeLa y HeLa-DsRed-Monómero después de 1 día de cultivo, a los cuales se les asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

A continuación se exploró la capacidad de las NS y HGNPs para generar hipertermia subletal capaz de activar la expresión del gen testigo DsRed-Monómero. Para ello, las células HeLa-DsRed-Monómero se incubaron en presencia de los materiales a concentraciones que oscilaron entre 0,005 y 0,05 mg/ml durante 24 h, para garantizar su completa internalización, y a continuación se expusieron a luz NIR durante 15-60 min. La irradiación con láser NIR de cultivos no expuestos a NPs no generó variación detectable de la temperatura del medio, establecida en 37°C, y consecuentemente, no se detectó inducción alguna de la expresión de la proteína DsRed-Monómero (filas superiores de las Fig. 34A-B y columna izquierda en la Fig. 35). En cultivos incubados en presencia de las NIR-NPs no se detectó fluorescencia en ausencia de irradiación (columna de la izquierda en las Fig. 34A y 34B). Por otra parte, el comportamiento fototérmico de las NS y HGNPs provocó un aumento de la temperatura del medio de cultivo dependiente de dosis, que se manifestó a través del aumento significativo de la intensidad de fluorescencia. En concordancia con los resultados mostrados en las Fig. 31 y 32, la irradiación de los cultivos tratados con las NS elevó la temperatura del medio de cultivo a niveles más altos que los registrados con tratamientos a dosis equivalentes de las HGNPs. La intensidad de fluorescencia de cultivos tratados con 0,005 mg/ml de NS o HGNPs aumentó en función de la duración de la exposición al láser, siendo superiores los niveles de expresión de la proteína DsRed-Monómero promovidos por las NS. Asimismo se detectó la existencia de una buena correlación entre la intensidad de fluorescencia y el tiempo de irradiación en cultivos tratados con 0,01 mg/ml de HGNPs, los cuales mostraron mayores niveles de fluorescencia que los cultivos incubados en presencia de 0,005 mg/ml e irradiados durante los mismos períodos de tiempo (Fig. 34B).

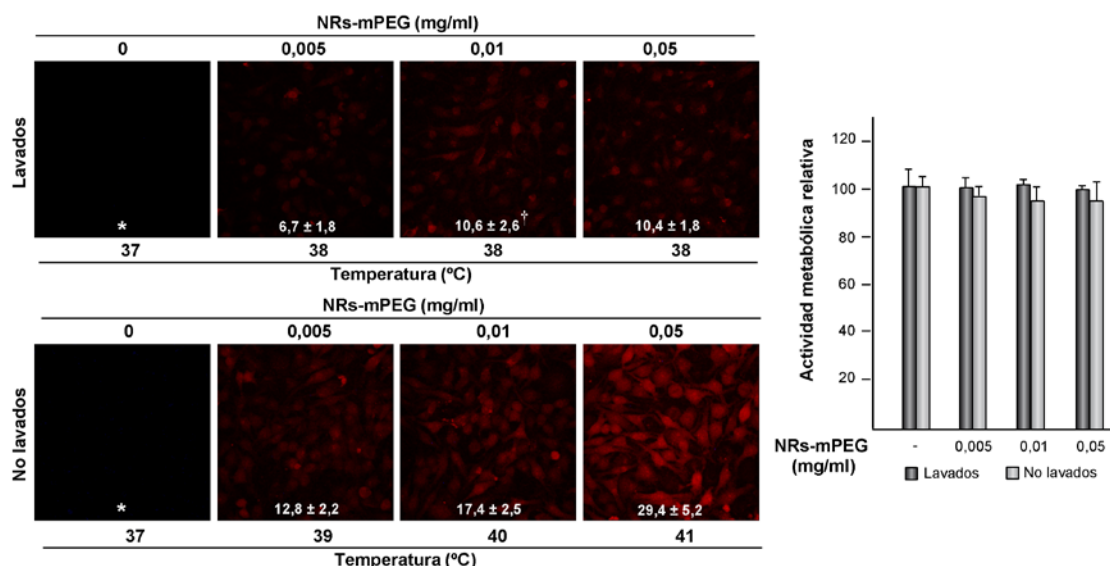




**Figura 34.** Modulación de la expresión de la proteína DsRed-Monómero por la inducción de calor mediada por NS y HGNPs. Paneles derechos: células HeLa-DsRed-Monómero tratadas o no (0) con las dosis indicadas de NS (A) o HGNPs (B) durante 24 h, expuestas o no (-) a láser NIR a 2 W/cm<sup>2</sup> durante 15, 30 y 60 min y cultivadas durante 24 h. Las proyecciones máximas muestran: expresión de DsRed-Monómero (rojo) y NS (A) o HGNPs (B) (azul) detectadas por reflexión. Los datos de temperatura en cultivos irradiados se obtuvieron empleando un termopar. Se indican los valores medios de intensidad de fluorescencia de DsRed ± DE. \* = No se detectó fluorescencia. La diferencia en la intensidad de fluorescencia entre cultivos tratados bajo idénticas condiciones con NS o HGNPs y entre cultivos tratados con diferentes tiempos de exposición al láser NIR y diferentes dosis de cada tipo de NIR-NPs fueron significativas ( $p < 0,05$ ) excepto en las siguientes condiciones: <sup>†</sup> $p > 0,05$  respecto a células tratadas con 0,005 mg/ml de NS y expuestas a láser durante 15 min; <sup>‡</sup> $p > 0,05$  respecto a células tratadas con 0,05 mg/ml de NS y expuestas a láser durante 60 min; <sup>§</sup> $p > 0,05$  respecto a células tratadas con 0,05 mg/ml de HGNPs y expuestas a láser durante 60 min; <sup>||</sup> $p > 0,05$  respecto a células tratadas con NS bajo las mismas condiciones. Paneles izquierdos: actividad metabólica de células HeLa-DsRed-Monómero tratadas o no (-) con las dosis indicadas de NS (A) o HGNPs (B) durante 24 h, expuestas a láser NIR y posteriormente cultivadas 24 h. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de fluorescencia determinado en células HeLa-DsRed-Monómero no tratadas, sometidas a irradiación con láser NIR y posteriormente cultivadas durante 1 día, al que se asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media ± DE de tres experimentos independientes. # $p < 0,05$  respecto a células tratadas con el material correspondiente y expuestas a láser NIR durante 30 min; & $p < 0,05$  respecto a células no tratadas con el material correspondiente, en las mismas condiciones experimentales.

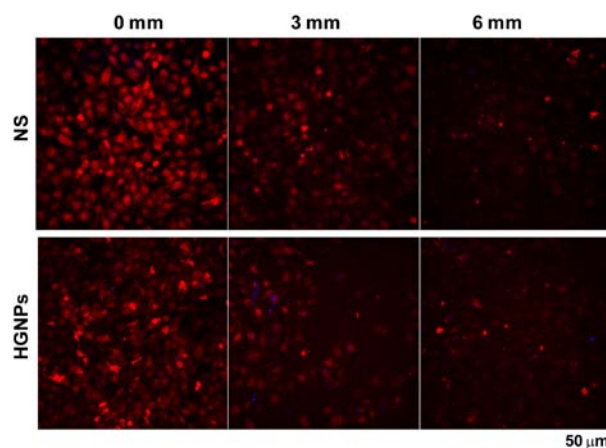
Se observó un comportamiento similar en cultivos tratados con 0,01 mg/ml de NS, a excepción de la exposición a láser NIR durante 60 min, en que la intensidad de fluorescencia disminuyó por debajo de los niveles detectados tras 30 min de irradiación. Este efecto podría atribuirse a una disminución sustancial de la viabilidad celular (Fig. 34A), como consecuencia del daño celular generado por el tratamiento térmico. En la misma figura se puede observar un efecto similar en cultivos tratados con 0,05 mg/ml de NS e irradiados con NIR, en los que se detectó una menor intensidad de fluorescencia y actividad metabólica que la correspondiente a la dosis de 0,01 mg/ml del mismo material e idénticos tiempos de estimulación con láser NIR. Por el contrario, la irradiación de cultivos tratados con la dosis más elevada de las HGNPs incrementó los niveles de expresión de DsRed-Monómero con respecto a los detectados con la dosis intermedia, excepto cuando la exposición al láser NIR se prolongaba 60 min, situación en la que se redujo la expresión del gen testigo probablemente como consecuencia de la disminución en la viabilidad de los cultivos (Fig. 34B).

La capacidad de los NRs-mPEG para generar hipertermias subletales capaces de inducir la expresión de la proteína fluorescente DsRed-Monómero fue mucho menor que la de las NS y HGNPs (Fig. 35). La irradiación de cultivos tratados con los NRs-mPEG y expuestos al láser NIR no fue suficiente para aumentar la temperatura del medio por encima de los 38°C a ninguna de las dosis ensayadas, lo que dio lugar a niveles de expresión de la proteína DsRed-Monómero significativamente más bajos que los generados por idénticas dosis de NS y HGNPs. Tampoco la hipertermia fotoinducida repercutió significativamente en la viabilidad celular. Estos resultados junto con los obtenidos previamente, sugieren una baja internalización del material, que limita la generación de hipertermias intracelulares suficientemente intensas para inducir la expresión del gen testigo. Para verificar esta hipótesis, se analizaron los niveles de intensidad de fluorescencia en células HeLa-DsRed-Monómero tratadas con las mismas dosis de los NRs-mPEG que en el caso anterior, omitiendo los lavados del material del cultivo previos a la exposición al láser NIR. En la Fig. 35 se observan los resultados de este ensayo, donde se aprecia un incremento, dependiente de dosis, de la temperatura del medio de cultivo y de la intensidad de fluorescencia detectada en la monocapa celular, que no afectó significativamente a la viabilidad de los cultivos.



**Figura 35.** Modulación de la expresión de la proteína DsRed-Monómero por la inducción de calor mediada por NRs-mPEG. Células HeLa-DsRed-Monómero tratadas o no (0) con las dosis indicadas de los NRs-mPEG durante 24 h, lavados o no, antes de la exposición a láser NIR a 2 W/cm<sup>2</sup> durante 30 min. A continuación, las células se lavaron con PBS, se suplementaron con DMEM-FBS fresco y se cultivaron durante 24 h. Las proyecciones máximas muestran la expresión de DsRed-Monómero (rojo). Los datos de temperatura en cultivos irradiados se obtuvieron empleando un termopar. Se indican los valores medios de intensidad de fluorescencia de DsRed ± DE. \* = No se detectó fluorescencia. Las diferencias en las intensidades de fluorescencia entre los cultivos tratados bajo idénticas condiciones con NS o HGNPs y entre cultivos tratados con diferentes tiempos de exposición al láser NIR y diferentes dosis de NRs-mPEG fueron significativas ( $p < 0,05$ ) excepto en la siguiente condición: <sup>†</sup> $p > 0,05$  respecto a células tratadas con 0,05 mg/ml de NRs-mPEG y posteriormente lavados del medio de cultivo. Panel izquierdo: actividad metabólica. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de fluorescencia determinado en células HeLa-DsRed-Monómero no tratadas, sometidas a irradiación con láser NIR y posteriormente cultivadas durante 1 día, al que se asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media ± DE de tres experimentos independientes.

Por último se valoró la intensidad de la hipertemia óptica subletal generada a través de una aproximación geométrica bidimensional. Para ello sólo se utilizaron las NS y HGNPs, ya que ambas son capaces de inducir expresión transgénica a través de la hipertemia óptica generada por el nanomaterial internalizado. La Fig. 36 muestra la existencia de un gradiente radial de expresión de la proteína DsRed-Monómero en respuesta a cambios de temperatura en la monocapa celular tras la exposición al láser NIR de cultivos tratados con 0,01 mg/ml de NS o HGNPs.

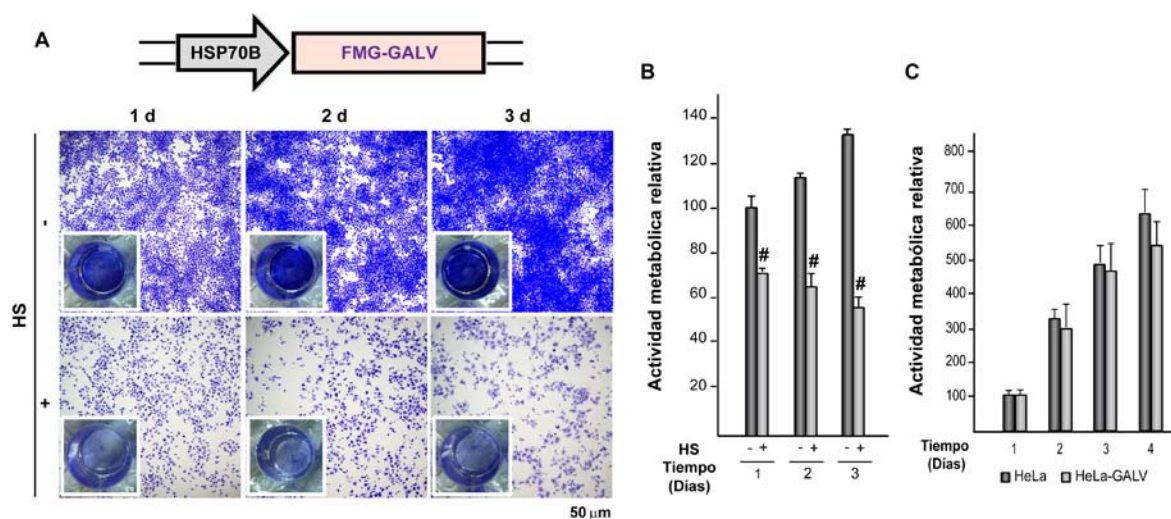


**Figura 36.** Gradiente de expresión de la proteína DsRed-Monómero. Expresión de la proteína fluorescente en células HeLa tratadas con 0,01 mg/ml de NS o HGNPs, expuestas a láser NIR a  $2 \text{ W/cm}^2$  durante 30 min a distancias del punto de incidencia del láser (0 mm) de 3 y 6 mm y cultivadas durante 24 h. Las proyecciones máximas muestran: expresión de DsRed-Monómero (rojo) y NS o HGNPs (azul) detectadas por reflexión.

### 3.5 Inducción de la expresión del gen terapéutico FMG-GALV mediante tratamiento fototérmico mediado por NIR-NPs

Una vez demostrado que los protocolos de hipertermia óptica basados en el uso de las NIR-NPs no sólo pueden promover la muerte de células tumorales, sino que también pueden ser empleados para inducir la expresión de transgenes, nos interesamos en explorar una estrategia que combinase ambas propiedades en un contexto de terapia antitumoral. Para llevar a cabo este estudio se generó la línea celular HeLa-GALV que expresa la glicoproteína hiperfusogénica FMG-GALV sometida al control del promotor del gen humano termosensible *HSP70B* (Fig. 37). La actividad citotóxica de la proteína FMG-GALV se basa en la fusión de células a través de su unión como trímero al receptor Pit-1, que se expresa en una amplia variedad de células tumorales, dando lugar a la formación de sincitios inviables (Hussain y col., 2011; Allen y col., 2004). Esta actividad antiproliferativa se propaga con alta eficiencia a la vecindad de células que expresan la proteína, siendo el efecto de proximidad asociado un orden de magnitud mayor al presentado por el sistema HSV1tk/GCV descrito en el apartado 2.4 (Bateman y col., 2000; Díaz y col., 2000). En la Fig. 37 se muestra el comportamiento de las células HeLa-GALV tras ser sometidas a tratamiento térmico en un baño termostatzado a  $45^\circ\text{C}$  durante 30 min. Se muestran imágenes de cultivos teñidos con cristal violeta (Fig. 37A) así como determinaciones de la actividad metabólica empleando el reactivo alamarBlue (Fig. 37B). Los resultados obtenidos reflejaron una dramática reducción de

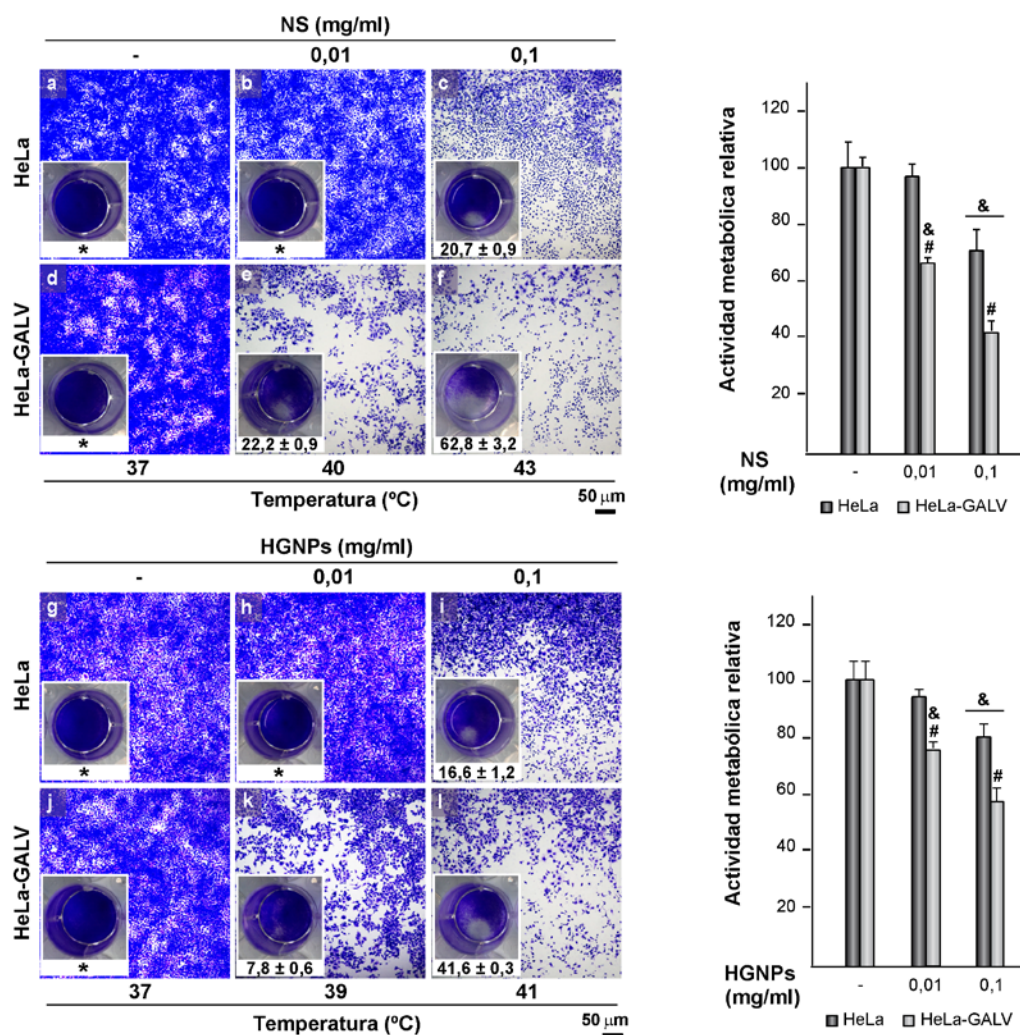
la densidad celular y la actividad metabólica tras la exposición a choque térmico. Los niveles de expresión del transgen en células HeLa-GALV que no han sido expuestas a choque térmico no genera actividad fusogénica que comprometa su tasa de proliferación celular, que presenta una cinética similar a la de células parentales (Fig. 37C). En resumen, la caracterización de la línea HeLa-GALV indicó que se trata de un modelo adecuado para explorar el potencial terapéutico de hipertermias ópticas subletales mediadas por NIR-NPs.



**Figura 37.** Caracterización de la línea celular HeLa-GALV. (A-B) Las células HeLa-GALV se sometieron (+) o no (-) a tratamiento térmico (HS) a 45°C durante 30 min y posteriormente se incubaron a 37°C durante 1-3 días. (A) Representación esquemática del gen FMG-GALV. Las imágenes muestran células teñidas con cristal violeta. Se muestran los pocillos de cultivo y microfotografías ópticas ampliando 4 veces el área del pocillo. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (B) Actividad metabólica de células HeLa-GALV. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de fluorescencia determinado en células HeLa-GALV no sometidas a tratamiento térmico y cultivadas durante 1 día, al cual se le asigna un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. # $p < 0,05$  respecto a células no sometidas a HS, dentro de un mismo tiempo. (C) Actividad metabólica de HeLa-GALV y HeLa cultivadas durante 1-4 días. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de fluorescencia determinados en células HeLa y HeLa-GALV después de 1 día de cultivo, a los cuales se les asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Basándonos en los resultados obtenidos en los ensayos descritos en los apartados 3.3 y 3.4, se emplearon dosis de 0,01 y 0,1 mg/ml de NS y HGNNs para generar hipertermias ópticas subletales y letales, respectivamente, en cultivos de células HeLa y HeLa-GALV expuestos a radiación de láser NIR durante 30 min (Fig. 38).





**Figura 38.** Modulación de la expresión de la proteína FMG-GALV por la inducción de calor mediada por NIR-NPs. Las células HeLa y HeLa-GALV se trataron con las dosis indicadas de NS (a-f) y HGNPs (g-l) durante 24 h y fueron expuestas a láser NIR a 2 W/cm<sup>2</sup> durante 30 min. A continuación, las células se cultivaron durante 2 días. Izquierda: Imágenes de células teñidas con cristal violeta. Microfotografías ópticas ampliando 4 veces el área de incidencia del láser. Las imágenes de los pocillos son representativas de tres experimentos independientes. Los números expresan los valores medios ± DE del tamaño del área ablacionada. \* = No se detecta área ablacionada. Los datos de temperatura se obtuvieron del medio de cultivo, empleando un termopar. Derecha: actividad metabólica. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de fluorescencia determinados en células HeLa y HeLa-GALV cultivadas durante 48 h después del tratamiento con láser NIR, a los cuales se les asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media ± DE de tres experimentos independientes. #p < 0,05 respecto a células HeLa en las mismas condiciones experimentales; &p < 0,05 respecto a células no tratadas con el material correspondiente.

Bajo condiciones de hipertermia óptica subletal, se observó que el área ablacionada en los cultivos de células HeLa-GALV fue de mayor tamaño cuando se utilizaron las NS en lugar de las HGNPs para conducir fototerapia (Fig. 38, imágenes e y k), mientras que los cultivos de células HeLa sometidos al mismo tratamiento no mostraban halo de ablación detectable (Fig. 38, imágenes b y h). Estos resultados, corroborados por la determinación de la actividad metabólica en los cultivos

(Fig. 38, paneles de la derecha) indicaron que células HeLa-GALV incubadas en presencia de las NS o HGNPs y expuestas a láser NIR promueven la expresión eficiente de FMG-GALV y la muerte celular como consecuencia de la actividad fusogénica inducida. Por otra parte, en ambas líneas celulares se observó que las condiciones de hipertermia óptica letal originaron la erosión de la monocapa celular. No obstante, el área ablacionada fue 3 veces mayor en las células que expresan el gen citotóxico que en cultivos de la línea celular parental. Estos datos, apoyados por las determinaciones de la actividad metabólica (Fig. 38, paneles de la derecha), demuestran que la combinación de protocolos que combinan fototermia y expresión de transgenes citotóxicos inducidos por hipertermia resulta en el establecimiento de una interacción sinérgica que potencia los efectos antiproliferativos individuales.





## ***DISCUSIÓN***



## 1. OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN DE MSN MEDIANTE FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL

Tal y como se ha indicado en el apartado Introducción, las propiedades físicas de las NPs inorgánicas como morfología, tamaño, densidad de carga y estabilidad coloidal son parámetros de gran importancia a la hora de determinar su potencial como vectores de transferencia génica (Tan y col., 2007). Es especialmente importante la obtención de NPs que experimenten la menor aglomeración posible en medios biológicos, lo cual depende en gran medida de la naturaleza de dichos medios. En este sentido diversas nanoestructuras, como por ejemplo fulerenos (Deguchi y col., 2007), nanotubos de carbono (Heister y col., 2010), grafeno (Liu y col., 2008) y NPs basadas en sílice (Díaz y col., 2008) muestran una alta estabilidad coloidal en agua que desaparece cuando los materiales son resuspendidos en medios de cultivo celular, sueros u otros fluidos biológicos. El método habitual para lograr la estabilidad coloidal, variando el pH de la dispersión para favorecer la repulsión electrostática de las NPs, no es factible cuando se persigue una aplicación biomédica, debido a que los valores de pH requeridos no son compatibles con la fisiología celular. Por ello, la estabilidad de las suspensiones de NPs se logra mediante la funcionalización superficial de las NPs con polímeros como PEG, PEI, PDDA, dextrano, chitosán, polipéptidos, copolímeros, etc.; con ligandos como albúmina, péptido-Tat, péptido RGD, ácido fólico, etc.; o con una combinación de ambos, para conseguir un impedimento estérico que impida la adsorción inespecífica de biomoléculas presentes en distintos medios fisiológicos (Kozlowski y Harris, 2001).

En este trabajo se han explorado MSN modificadas superficialmente mediante unión covalente a grupos  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-NH}_4^+$  y/o recubiertas con los polímeros catiónicos PDDA o PEI. Hemos observado que en función de la naturaleza de los grupos amino conjugados a la superficie de las MSN, éstas pueden dispersarse en medios de cultivo minimizando su aglomeración. En relación a la carga superficial, los grupos catiónicos  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-NH}_4^+$  y polímeros catiónicos PEI y PDDA empleados en la funcionalización de las MSN generan un potencial zeta superficial positivo en agua. Esta carga superficial invierte su polaridad cuando las MSNF se dispersan en DMEM-FBS, a excepción de las MSN-PEI que conservan una carga superficial neta positiva al enfrentarse a este medio. De este modo, el polímero catiónico PEI es capaz de promover la adsorción eficiente de moléculas de ADN plasmídico a través de fuertes interacciones electrostáticas (Tan y col., 2007).

De todas las MSNF estudiadas, sólo se consigue transferencia génica cuando se emplea el material MSN-PEI como agente portador de moléculas de ADN plasmídico, sugiriendo que la conformación de grupos catiónicos sobre la superficie de las partículas es un factor clave para la transferencia génica. Estos resultados positivos de transfección con las MSN recubiertas de PEI coinciden con los observados por otros autores en distintas líneas celulares (Xia y col., 2009; Yiu y col., 2007; Rosenholm y col., 2009). Las MSN-PEI mostraron una eficiencia de transfección similar a la del polímero PEI utilizado de manera aislada, pero curiosamente, la transferencia génica con MSN requiere menores cantidades de ADN. Además, la eficiencia de transfección alcanza valores máximos si el ratio (p/p) NPs/ADN es de 83:1, lo que sugiere la existencia de una relación óptima entre la cantidad de plásmido a conjugar y la masa de MSN-PEI que lo incorpora. De hecho, trabajos realizados por otros autores señalan la importancia de optimizar la relación (p/p) NPs/ADN, que ejerce una gran influencia sobre la capacidad de transfección de las NPs de sílice (Kneuer y col., 2000; Park y col., 2008; Tan y col., 2007). Es importante destacar que el proceso de transfección empleando las MSN-PEI caracterizadas en este trabajo se produce en presencia de suero, lo que supone una ventaja adicional para el uso de estos materiales en experimentos con cultivos celulares. A pesar de la eficiencia mostrada por los complejos MSN-PEI/ADN para transfectar células humanas, ésta fue aproximadamente 3 veces menor que la detectada empleando las GNPs-PEI < 10 nm. Este hecho podría atribuirse a la disminución de la viabilidad celular detectada en cultivos incubados en presencia de los complejos MSN-PEI/ADN, resultando en un bajo porcentaje de células transfectadas cuya capacidad para expresar proteínas transgénicas no esté comprometida. De hecho, una de las desventajas de la funcionalización catiónica de la superficie de las NPs diseñadas para transferencia génica es su posible toxicidad, ampliamente descrita en el caso del polímero PEI ramificado con peso molecular de aproximadamente 25 kDa (Roesler y col., 2011; Bahadur y col., 2011). Xia y col., (2009) demostraron que esta toxicidad se podía reducir o eliminar empleando para el recubrimiento moléculas de PEI de menor peso molecular, de manera que se conservan niveles similares de condensación de ácidos nucleicos en la superficie del material mejorando significativamente la biocompatibilidad de los conjugados. Probablemente, la asociación subóptima de moléculas de ADN a la superficie de las MSN-PEI impide el apantallamiento de la totalidad de las cargas superficiales positivas, efecto observado en otros estudios (Wang y col., 2006). La interacción de la membrana celular, cargada negativamente, con

fuerzas iónicas de polaridad positiva conduce a la lisis celular. Debido a esto, resulta de vital importancia mantener la carga neta superficial de materiales funcionalizados catiónicamente en valores óptimos para garantizar el compromiso entre la capacidad de condensación de ácidos nucleicos y su potencial citotóxico.

La endocitosis es el mecanismo principal de internalización de las NPs de sílice (Xing y col., 2005; Chu y col., 2011). Datos existentes en la literatura indican que las MSN funcionalizadas con PEI y cargadas con un fluoróforo son capaces de internalizarse vía endocitosis mediada por receptor, para posteriormente liberar moléculas del fluoróforo al citoplasma celular a través del mecanismo de escape endosomal (Rosenholm y col., 2009). La desestabilización de la membrana endosomal podría explicar la liberación de las moléculas de plásmido y la capacidad de transfección de las MSN-PEI. Se ha postulado que la alta carga positiva presente en los complejos de NPs catiónicas/ADN les confiere la capacidad de fusión con la membrana de vesículas endocíticas, permitiendo la liberación del ADN al citoplasma celular (Wang y col., 2006). Alternativamente, los complejos poliméricos basados en PEI/ADN, también con elevada densidad de carga catiónica, provocarían la ruptura de vesículas endocíticas a través del mecanismo de “esponja de protones” liberando su contenido y permitiendo la llegada de las biomoléculas a su destino intracelular (Boussif y col., 1995; Sonawane y col., 2003).

La incapacidad del resto de las especies de MSNF analizadas para transfectar células osteoblásticas humanas podría deberse a la falta de internalización de los complejos MSNF/ADN. El análisis de las imágenes de MCLB de dichos complejos informó de la existencia de grandes aglomerados de ADN tras su adsorción a las MSN funcionalizadas con  $\text{-NH}_4^+$ ,  $\text{-NH}_2$  o  $\text{-NH}_2\text{-PDDA}$ , lo que imposibilita su internalización en la célula. Sin embargo, la población de los complejos MSN-PEI/ADN muestra una disminución en su radio hidrodinámico de aproximadamente 10 veces con respecto a las MSN-PEI, lo que sugiere que las moléculas de ADN podrían actuar como agentes desaglomerantes. Un efecto semejante se ha descrito en trabajos anteriores para NPs basadas en óxidos de cinc y de titanio en suspensiones acuosas en presencia de proteínas, las cuales son capaces de promover el proceso de desaglomeración de estos materiales (Sager y col., 2007; Tantra y col., 2010).

Tomados en conjunto estos resultados indican que las MSN-PEI son la única especie de MSNF que, en las condiciones experimentales ensayadas, son capaces de transferir moléculas de plásmido funcionales a células osteoblásticas humanas en

presencia de suero. La funcionalización de las MSN con PEI otorga una carga superficial positiva en DMEM-FBS que permite la unión efectiva de moléculas plasmídicas funcionales que a su vez ejercen un efecto desaglomerante sobre el material. La contribución de ambas características es necesaria para la internalización de este tipo de MSN y la transfección de las células empleadas en este estudio.

## **2. OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN DE GNPs MEDIANTE FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA**

Estudios recientes indican que el tamaño de las GNPs juega un papel muy importante en el proceso de internalización celular, y por tanto, en la eficiencia de transfección de estos materiales (Chithrani, 2010). Con el fin de analizar la influencia de las dimensiones del material utilizado para transportar moléculas de ADN se sintetizaron dos especies de GNPs con una diferencia de tamaño de aproximadamente un orden de magnitud.

Como se ha comentado, la densidad de carga superficial de las NPs es un parámetro crítico que determina su capacidad para actuar como vectores de transferencia génica. En este sentido, como se esperaba, los valores positivos de potencial zeta de las GNPs-PEI detectados en tampón FS 50 mM a pH fisiológico favorecieron la adsorción de moléculas plasmídicas a su superficie. Sin embargo, esta capacidad de adsorción fue diferente dependiendo del tamaño de partícula. Estos resultados se correlacionan con la cantidad de PEI contenido en la superficie de las NPs. La cuantificación de PEI superficial reveló que la cantidad de polímero presente en las GNPs-PEI < 10 nm es 3 veces superior a la obtenida en las GNPs-PEI < 100 nm. Probablemente este hecho se deba a que la superficie externa por unidad de masa es aproximadamente un orden de magnitud mayor en las GNPs-PEI < 10 nm que en las de < 100 nm, maximizando la cantidad de PEI disponible para la unión electrostática de las moléculas diana (Hu y col., 2010).

Como ya se ha indicado, el efecto citotóxico del polímero PEI ramificado ha sido descrito en diversos tipos celulares (Roesler y col., 2011; Bahadur y col., 2011). En este sentido, la mayor carga de PEI por unidad de superficie observado en las GNPs-PEI < 10 nm sería, indudablemente, un factor que podría contribuir al mayor grado de citotoxicidad de estas NPs. La adsorción de moléculas plasmídicas a la

superficie del material redujo notablemente la toxicidad de las GNPs-PEI < 10 nm. Las cargas positivas todavía disponibles tras la absorción del biopolímero serían las responsables de cierta lisis celular en un pequeño porcentaje de células debido a su interacción electrostática con la membrana celular. Este efecto ha sido previamente observado en GNPs funcionalizadas con grupos amino cuaternarios (Goodman y col., 2004) y también en complejos PEI/ADN (Godbey y col., 2001). Al contrario que lo observado en las MSN-PEI, el ADN absorbido a la superficie de las GNPs-PEI < 10 nm parece condensarse de forma más eficiente en la superficie del material, produciendo un efecto de apantallamiento de la excesiva carga superficial positiva que mejora significativamente la biocompatibilidad de los complejos GNPs-PEI/ADN < 10 nm. Curiosamente, las suspensiones de los dos tipos de complejos, GNPs-PEI/ADN < 10 y < 100 nm, en DMEM-FBS muestran una carga superficial negativa en presencia de plásmido. Sin embargo, este hecho no impide que ambos tipos de complejos sean eficientemente internalizados en las células a pesar de la idea generalizada que declara la necesidad de una elevada carga positiva superficial para la internalización celular (Kneuer y col., 2000). Estudios realizados con NPs magnéticas funcionalizadas con ligandos aniónicos también muestran un elevado grado de internalización en las células a través de interacciones no específicas de tipo electrostático con regiones de la membrana plasmática cargadas positivamente (Wilhelm y col., 2003). En este sentido, se ha postulado que aunque la superficie celular posee grandes dominios cargados negativamente existen dominios con carga positiva donde se podrían concentrar biomoléculas aniónicas o NPs cargadas negativamente, permitiendo su internalización (Mutsaers y col., 1998; Miller y col., 1998). Por otro lado se ha descrito que las moléculas de ADN al igual que las de otros polianiones se pueden internalizar a través de receptores *scavenger* localizados en la superficie de muchos tipos celulares, incluidas células osteoblásticas (Wattiaux y col., 2000; Brodeur y col., 2008). Finalmente, la capacidad de sedimentación de los complejos GNPs-PEI/ADN sobre la membrana celular podría ser también un factor importante en el proceso de internalización de estos materiales a través de mecanismos de endocitosis, superando la barrera de repulsión electrostática inicial.

De forma similar a lo observado en las MSN-PEI, la eficiencia de transfección de las GNPs-PEI < 10 nm es dependiente de una relación (p/p) NPs/ADN que fue óptima a un ratio de 42:1, demostrándose que dicha eficiencia no mejora al incrementar la masa de NPs que se acomplejan con una cantidad fija de moléculas plasmídicas o al

augmentar la cantidad de biopolímero adsorbida a la superficie del material. En este sentido, otros autores coinciden en señalar la existencia de una relación GNPs/ADN que optimiza la transferencia génica (Thomas y col., 2003; Noh y col., 2007; Niidome y col., 2004) y que varía en función de las características del material y el tipo celular ensayado. Tal y como se señaló con las MSN-PEI, es importante destacar que la transfección de las GNPs-PEI < 10 nm ocurre en presencia de suero, lo que supone una ventaja adicional para el uso de estas NPs en experimentos *in vitro*.

Los experimentos de transfección empleando un plásmido fluorescente indicaron que las GNPs-PEI < 100 nm son capaces de atravesar la membrana plasmática y liberar las moléculas de plásmido al interior celular. Por consiguiente, y al contrario que lo observado en el caso de las MSN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, MSN-NH<sub>2</sub> y MSN-NH<sub>2</sub>-PDDA, estos datos excluyen una internalización deficiente como causa de la ausencia de transfección observada con las GNPs de mayor tamaño, y sugieren que los mecanismos de tráfico intracelular podrían estar condicionando la localización del plásmido y la expresión del transgen. En este sentido, hemos observado una prolongada colocalización, a lo largo de tres días, de la señal derivada del plásmido fluorescente liberado por las GNPs-PEI < 100 nm y la GTPasa RhoB, localizada en la superficie de endosomas tempranos y orgánulos multivesiculares prelisosomales (Adamson y col., 1992; Robertson y col., 1995). Sin embargo, cuando se estudia la colocalización del plásmido fluorescente transportado por las GNPs-PEI < 10 nm sólo se detecta su señal en estos compartimentos celulares tras 1 h de incubación de las células con los complejos, estando ausente a tiempos de incubación mayores, lo que sugiere que las moléculas de plásmido conjugadas a las GNPs-PEI de < 10 nm son capaces de liberarse de estos orgánulos. Como ya se ha mencionado antes, diversos autores han demostrado que el tamaño de las GNPs juega un papel importante en el proceso de internalización celular (Xu y col., 2004; Chithrani y col., 2006; Amida y Ghandehari, 2009), siendo la endocitosis el principal mecanismo de internalización celular empleado por las GNPs (Li y col., 2008; Shukla y col., 2005; Uboldi y col., 2009). El menor tamaño de las GNPs-PEI < 10 nm maximiza la unión superficial del polímero PEI que no sólo mejora la unión electrostática del plásmido a las partículas sino que probablemente contribuye a la desestabilización de la membrana endosomal permitiendo la liberación de las moléculas de ADN. En este sentido, Li y col., (2008) observaron que GNPs de 14 nm de diámetro funcionalizadas con un lípido catiónico, bromuro de dimetildioctadecilamonio, son capaces de transfectar gracias a un mecanismo de



liberación endosomal de las moléculas plasmídicas. Las interacciones de los complejos GNP-PEI/ADN  $< 10$  nm con los componentes lipídicos aniónicos localizados en las membranas de las vesículas endocíticas podrían facilitar el escape endosomal mediante el ya citado mecanismo de “esponja de protones” (Boussif y col., 1995; Sonawane y col., 2003).

El análisis de las imágenes obtenidas por MET permitió detectar ambos tipos de GNP-PEI en el citoplasma celular. Mediante esta técnica se detectan grandes aglomerados de material inorgánico en el caso de las GNP-PEI  $< 100$  nm, que además presentan ADN acoplado a su superficie como se pudo comprobar en ensayos de colocalización mediante MCLB. El gran tamaño de estos aglomerados probablemente impida su incorporación en vesículas compatibles con la vía lisosomal. Sin embargo, las GNP-PEI  $< 10$  nm se localizan en forma de partículas aisladas dentro de estructuras de menor tamaño con características morfológicas típicas de lisosomas y cuerpos residuales. El bajo estado de aglomeración de las GNP-PEI de menor tamaño podría contribuir a mejorar el proceso de liberación de las moléculas plasmídicas del interior de las vesículas endocíticas. Los plásmidos transferidos por las GNP-PEI  $< 10$  nm acceden rápidamente al interior del núcleo celular, pudiéndose detectar tras 2 h de incubación de los cultivos celulares con los complejos GNP/ADN. Hasta la fecha, los mecanismos de tráfico intracelular que utilizan las moléculas de plásmido transportadas por GNP para llegar al núcleo no se han estudiado con detalle. Algunos datos existentes en la literatura asocian el éxito de transfección con la entrada de las GNP en el núcleo (Thomas y col., 2003). Sin embargo, el examen exhaustivo de las imágenes obtenidas por MET de células tratadas con los complejos GNP-PEI/ADN  $< 10$  nm no pudo identificar la presencia de GNP-PEI en el interior de los núcleos celulares. Estos datos indican que la entrada de NP al interior del núcleo no es requisito para el desarrollo de una transfección eficiente. Dado que las GNP-PEI  $< 10$  nm no llevan acopladas ninguna señal de localización nuclear que permita la translocación de moléculas de ADN a través de los poros nucleares (Del Pozo-Rodríguez y col., 2008), es probable que la entrada al núcleo de estas moléculas ocurra durante la mitosis, cuando la membrana nuclear desaparece de forma transitoria.

En conjunto nuestros resultados indican que el tamaño de las GNP-PEI es una propiedad clave que determina la capacidad de transfección de estos materiales. Mientras que las GNP-PEI  $< 100$  nm son incapaces de transfectar células humanas, las GNP-PEI  $< 10$  nm actúan como vectores de transferencia génica más eficientes que las

MSN-PEI en medios de cultivo que contienen suero. A pesar de la repulsión electrostática que se produce entre la membrana celular y la superficie de los complejos GNPs-PEI/ADN, ambos tipos de GNPs acceden al interior celular. Por lo tanto, al contrario que en las MSNF, la falta de internalización no es un factor limitante en la capacidad de transfección de las GNPs-PEI  $< 100$  nm. La diferencia en la capacidad de transfección entre las GNPs-PEI  $< 10$  nm y  $< 100$  nm se puede explicar en términos de liberación endosomal de las moléculas de ADN transportadas por las GNPs-PEI de menor tamaño.

Es importante señalar la posibilidad de modificar la geometría y la composición de las GNPs, lo que les permite adquirir propiedades adicionales a su cualidad para transferir genes y aumenta su potencial en aplicaciones biomédicas. Además de presentar interés como agentes para hipertermia óptica en el tratamiento de tumores sólidos, la modificación en la geometría y composición permiten adoptar características atractivas para su uso como agentes de contraste en técnicas de imagen o como biosensores (von Maltzahn y col., 2009; Cai y col., 2008).

### **3. CAPACIDAD DE NIR-NPs BASADAS EN ORO PARA GENERAR HIPERTERMIA ÓPTICA EN CÉLULAS HUMANAS**

En este estudio hemos explorado un nuevo enfoque para incrementar la eficacia de protocolos de hipertermia óptica mediante el control de la expresión transgénica en un contexto de terapia antitumoral. Centrándonos en esta idea hemos caracterizado el comportamiento fototérmico de tres especies diferentes de NIR-NPs basadas en oro: NS, HGNPs y NRs-mPEG.

El estudio del comportamiento fototérmico de las NIR-NPs dispersas en DMEM-FBS reveló que tras la excitación con láser NIR, las HGNPs son más eficientes fototérmicamente que una masa equivalente de NS o NRs-mPEG. Curiosamente, cuando se estudia el comportamiento fototérmico de estos materiales tras su incubación en cultivos celulares y posteriores lavados, la transferencia térmica detectada fue mayor en cultivos tratados con las NS que en cultivos expuestos a las HGNPs. En estos ensayos la capacidad fototérmica de los NRs-mPEG fue mucho menor que la de las NS o las HGNPs. Esta asimetría corrobora la influencia decisiva de parámetros tales como la dinámica de sedimentación de las NPs o su estado de aglomeración debido a la interacción de los nanomateriales con el entorno biológico (Cho y col., 2011). Las

HGNPs y los NRs-mPEG son, en términos de densidad de masa, especies más ligeras que las NS y por tanto menos propensas a sedimentar en la superficie celular. Según esto, en condiciones donde los cultivos celulares se incuban con la misma cantidad de las tres especies de NIR-NPs, la concentración de NS retenida por la capa celular tendería a ser mayor que en el caso de las incubaciones con HGNPs y NRs-mPEG. En este sentido Cho y col., (2011) han demostrado recientemente que la captación celular de las GNPs depende en gran medida de la velocidad de sedimentación y difusión de las NPs. Por otro lado, la agregación ocurre cuando la fuerza de repulsión producida por la superficie del material es menor que la fuerzas de van der Waals de atracción entre partículas. Este balance es altamente dependiente de la concentración de iones y/o del contenido proteico del medio biológico donde se encuentre disperso el material (Lundqvist y col., 2008). Las HGNPs estudiadas en este trabajo mostraron una mayor tendencia a la agregación que las NS y los NRs-mPEG, dando lugar a una distribución del tamaño de partícula muy heterogéneo y detectándose complejos de gran tamaño. Esta característica podría estar ligada a la menor capacidad del nanomaterial para ser internalizado por las células, parámetro altamente dependiente del tamaño de los aglomerados de las NPs (Albanese y Chan, 2011). Los NRs-mPEG no son detectables mediante microscopía confocal, debido probablemente a su bajo estado de aglomeración, lo que impide su visualización en nuestro sistema experimental. Esta hipótesis está de acuerdo con los datos publicados por Rostro-Kohanloo y col., (2009) que indican que la estabilización de NRs mediante la adición de grupos mPEG a su superficie disminuye su estado de agregación.

Hasta la fecha, el destino intracelular de las NIR-NPs ha sido escasamente estudiado. Al igual que en otros tipos de NPs inorgánicas, se reconoce que parámetros como el tamaño y la carga superficial, así como el tipo celular son críticos en el proceso de internalización celular. Las NPs podrían acceder al interior celular a través de un mecanismo de endocitosis no específica, concentrándose en compartimentos subcelulares en forma de agregados. Los ensayos de fluorescencia indican que las NS y HGNPs estudiadas utilizan la vía endocítica para internalizarse en células HeLa. Se han descrito múltiples mecanismos de endocitosis para la internalización de NPs con características físico-químicas muy diferentes, incluyendo la fagocitosis, pinocitosis e internalización mediada por vesículas de clatrina o caveolina. Sin embargo, aún no se ha definido qué características de las NPs determinan su mecanismo de internalización. Los agregados de ambas especies de NIR-NPs se detectaron en el interior de endosomas

tras 24 h de incubación con las células, siendo el tamaño promedio de los complejos de NS internalizados así como el número de aglomerados por células, mayores que los detectados tras el tratamiento con las HGNPs. Las cuantificaciones de la masa de oro retenida dentro de la monocapa celular corroboraron esta información, lo que indica que la captación celular de las NS es mayor que la de las HGNPs.

Como se ha mencionado antes, las GNPs son biocompatibles aunque hay diferencias notables en cuanto a su citotoxicidad, dependiendo del agente surfactante y/o de recubrimiento, tamaño y forma (Goodman y col., 2004; Connor y col., 2005; Takahashi y col., 2006; Chithrani y col., 2006). En el caso de los NRs durante su síntesis se emplea como surfactante y estabilizador el CTABr cuya toxicidad ha sido ampliamente descrita (von Maltzahn y col., 2009; Lee y col., 2009). Sin embargo, el recubrimiento de este tipo de materiales con el polímero neutro PEG, además de aumentar su estabilidad coloidal mejora significativamente su biocompatibilidad (Rayavarapu y col., 2010). Las tres especies de NIR-NPs ensayadas en este trabajo mostraron una excelente biocompatibilidad como se demostró mediante cuantificación de la actividad metabólica en cultivos de células HeLa tratadas con dosis de hasta 0,1 mg/ml de material. La irradiación con láser NIR de los cultivos tratados con dosis biocompatibles de las NIR-NPs resultó en muerte celular, restringida a la zona de alcance del láser. Cabe destacar que bajo condiciones de hipertermia óptica letal la temperatura del medio de cultivo no aumentó a niveles que, *a priori*, podrían afectar a la viabilidad celular, como ocurre en cultivos sometidos a 45°C durante 60 min en un baño termostatzado. La irradiación con láser NIR de cultivos celulares sometidos a sucesivos lavados para eliminar las NIR-NPs no internalizadas por las células, registró temperaturas en el medio de cultivo de hasta 43°C para las NS y 41°C para las HGNPs, valores que corresponden a un rango de hipertermia moderada. Por lo tanto, los efectos deletéreos observados en cultivos celulares tratados con las NIR-NPs y expuestos a láser NIR deben atribuirse, exclusivamente, al incremento de temperatura intracelular generado a partir de las especies plasmónicas que interaccionan con las células y no a la hipertermia “extracelular”. Por el contrario, cultivos tratados con los NRs-mPEG, lavados y posteriormente expuestos al láser NIR no registraron incrementos de temperatura superiores a 38°C, sugiriendo que la baja capacidad de internalización de este tipo de material impide el establecimiento de un nivel de hipertermia suficiente para desencadenar el proceso de muerte celular. En concordancia con nuestros resultados, otros autores han detectado que el recubrimiento con PEG disminuye la

capacidad de internalización de los NRs (Rayavarapu y col., 2010; Huff y col., 2007). De acuerdo con estudios previos donde se comparan NS, HGNPs y NRs, la capacidad fototérmica fue mayor en cultivos tratados con las NS, generando unos niveles de muerte celular mayores (Cheng y col., 2009). La hipertermia causa un daño celular irreversible a través de la desnaturalización de proteínas, lo que implica la inactivación de enzimas, receptores de membrana y transportadores iónicos que conducen a cambios en la permeabilidad de la membrana, la despolimerización de estructuras del citoesqueleto y la agregación masiva de proteínas (Laszlo, 1992). Tras la exposición a láser NIR de cultivos tratados con las NS o HGNPs, se detectó daño en la membrana celular, una disminución de la actividad esterasa y la desorganización del citoesqueleto de actina. Estos efectos fueron más notables en células incubadas con las NS. En concordancia con literatura reciente que señala la apoptosis como uno de los mecanismos principales que controlan la muerte celular inducida por tratamiento fototérmico (Kirui y col., 2010; Hong y col., 2011), la irradiación con láser NIR de cultivos celulares tratados con las NS y HGNPs aumentó los niveles de la proteína caspasa-3 activa, efector característico de la cascada apoptótica.

La activación de promotores de choque térmico tras tratamiento fototérmico dirigido por nanomateriales basados en carbono ha demostrado ser una herramienta útil para controlar la expresión transgénica tanto *in vitro* como *in vivo* (Miyako y col., 2012). En este trabajo, hemos demostrado que las propiedades ópticas de las NIR-NPs pueden modular los niveles de expresión de un gen testigo controlado por el promotor del gen humano termosensible *HSP70B*, en función de la concentración del nanomaterial y de la duración de la exposición al láser NIR. Basándonos en este concepto, hemos explorado la capacidad del tratamiento fototérmico para expresar una glicoproteína viral hiperfusogénica de membrana. Los tratamientos de hipertermia óptica que no desencadenan mecanismos de muerte celular en células HeLa no modificadas, claramente generaron un efecto citotóxico en células que albergan la secuencia de FMG-GALV bajo el control del promotor del gen *HSP70B*. La magnitud de este efecto se puso de manifiesto bajo condiciones de hipertermia letal, que resultaron en un aumento dramático del área afectada en los cultivos de células que albergan el transgen antiproliferativo. En resumen, los datos obtenidos constituyen una prueba de concepto que demuestra la posibilidad de superar la eficacia limitada de la transferencia génica para lograr un mayor control espacial y temporal de la expresión de transgenes terapéuticos en el órgano necesitado de terapia, además de amplificar la

potencia terapéutica de un tratamiento fototérmico en el contexto de una terapia antitumoral. Desde un punto de vista terapéutico, las dosis óptimas de las NIR-NPs a utilizar vendrán dictaminadas por los requisitos específicos de la aplicación concreta así como por la naturaleza del gen terapéutico (vida media, potencia...). Asimismo, la combinación de terapia génica y fototerapia podría proporcionar una solución efectiva para mejorar la limitada capacidad de penetración del láser NIR en los tejidos biológicos.

## ***CONCLUSIONES***





De todo lo expuesto, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La carga superficial de las NPs de sílice mesoporosa funcionalizadas (MSNF) así como su estabilidad coloidal en el medio de cultivo son factores clave en el proceso de transfección.
2. La funcionalización de las NPs de sílice mesoporosa con PEI (MSN-PEI) otorga al material una carga superficial neta positiva cuando es dispersado en medio de cultivo conteniendo suero fetal bovino (DMEM-FBS). Este efecto permite la unión efectiva de moléculas plasmídicas que ejercen un efecto desaglomerante sobre el material, permitiendo la transfección de células humanas.
3. El tamaño de las NPs de oro funcionalizadas con PEI (GNPs-PEI) es una propiedad clave que determina su eficiencia de transfección. Diámetros en torno a 6 nm confieren a las NPs la capacidad de funcionar como agentes de transfección en células humanas, propiedad de la que carecen las NPs con diámetros de un orden de magnitud superior.
4. Ambos tipos de NPs de oro funcionalizadas con PEI acceden al interior celular, explicándose la eficiencia en la transferencia génica de las de menor tamaño en términos de liberación endosomal de las moléculas de ADN.
5. El estudio comparativo del comportamiento fototérmico de *nanoshells* (NS), NPs de oro huecas (HGNPs) y *nanorods* acoplados a metil-polietilenglicol-tiol (NRs-mPEG) revela que tras la excitación con láser en el infrarrojo cercano (NIR), las NPs de oro huecas son las más eficientes fototérmicamente. Sin embargo, la transferencia térmica es mayor en cultivos incubados en presencia de las nanoshells mientras que el potencial calorífico de los *nanorods* se encuentra muy limitado debido a una deficiente internalización celular.
6. Las propiedades ópticas de las *nanoshells* y NPs de oro huecas permiten modular los niveles de expresión de un gen testigo controlado por el promotor del gen humano termosensible *HSP70B*, en función de la concentración del nanomaterial y el tiempo de exposición al láser. La adaptación de esta estrategia para controlar la expresión de la glicoproteína hiperfusogénica GALV resulta en la amplificación de la potencia del tratamiento fototérmico.



## ***BIBLIOGRAFÍA***



- Abu-Salah KM, Ansari AA, Alrokayan SA. DNA-Based applications in nanobiotechnology. *J Biomed Biotechnol* 2010, 2010: 715295-715310.
- Adamson P, Paterson HE, Hall A. Intracellular localization of the p21rho proteins. *J Cell Biol* 1992, 119: 617-627.
- Aden AL, Kerker M. Scattering of electromagnetic waves from two concentric spheres. *J Appl Phys* 1951, 22: 1242-1246.
- Ahamed M, AlSalhi MS, Siddiqui MKJ. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta* 2010, 411: 1841-1848.
- Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine* 2012, 7: 845-857.
- Albanese A, Chan WCW. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano* 2011, 5: 5478-5489.
- Alkilany AM, Nalaria PK, Hexel CR, Shaw TJ, Murphy CJ, Wyatt MD. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small* 2009, 5: 701-708.
- Allen C, McDonald C, Giannini C, Peng KW, Rosales G, Russell SJ, Galanis E. Adenoviral vectors expressing fusogenic membrane glycoproteins activated via matrix metalloproteinase cleavable linkers have significant antitumor potential in the gene therapy of gliomas. *J Gene Med* 2004, 6: 1216-1227.
- Arnida MA, Ghandehari H. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *J Appl Toxicol* 2009, 30: 212-217.
- Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, González-Fernández A. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers* 2011, 3: 3279-3330.
- Bahadur KC, Landry B, Aliabadi HM, Lavasanifar A, Uludag H. Lipid substitution on low molecular weight (0.6-2.0 kDa) polyethylenimine leads to a higher zeta potential of plasmid DNA and enhances transgene expression. *Acta Biomater* 2011, 7: 2209-2217.

Balas F, Manzano M, Colilla M, Vallet-Regí M. L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation. *Acta Biomater* 2008, 4: 514-522.

Basel MT, Balivada S, Wang H, Shrestha TB, Seo GM, Pyle M, Abayaweera G, Dani R, Koper OB, Tamura M, Chikan V, Bossmann SH, Troyer DL. Cell-delivered magnetic nanoparticles caused hyperthermia-mediated increased survival in a murine pancreatic cancer model. *Int J Nanomedicine* 2012, 7: 297-306.

Bateman A, Bullough F, Murphy S, Emiliusen L, Lavillette D, Cosset FL, Cattaneo R, Russell SJ, Vile RG. Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer Res* 2000, 60: 1492-1497.

Bergman L, Rosenholm J, Öst AB, Duchanoy A, Kankaanpää P, Heino J, Lindén M. On the complexity of electrostatic suspension stabilization of functionalized silica nanoparticles for biotargeting and imaging applications. *J Nanomater* 2008, 2008: 1-9.

Bernardi RJ, Lowery AR, Thompson PA, Blaney SM, West JL. Immunonanoshells for targeted photothermal ablation in medulloblastoma and glioma: An in vitro evaluation using human cell lines. *J Neurooncol* 2008, 86: 165-172.

Bharali DJ, Klejbor I, Stachowiak EK, Dutta P, Roy I, Kaur N, Bergey EJ, Prasad PN, Stachowiak MK. Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. *PNAS* 2005, 32: 11539-11544.

Bianco A, Kostarelos K, Partidos CD, Prato M. Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chem Commun* 2005, 7: 571-577.

Bitar A, Ahmad NM, Fessi H, Elaissari. Silica-based nanoparticles for biomedical applications. *Drug Discov Today* 2012, 17: 1147-1154.

Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev* 2009, 38: 1759-1782.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *PNAS* 1995, 92: 7297-7301.

- Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Luangrath V, Moreau R. Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL3. *J Bone Miner Res* 2008, 23: 326-337.
- Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl* 2008, 1: 17-32.
- Carpin LB, Bickford LR, Agollah G, Yu TK, Schiff R, Li Y, Drezek RA. Immunoconjugated gold nanoshell-mediated photothermal ablation of trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2011, 125: 27-34.
- Chan WCW, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998, 281: 2016-2018.
- Chen CC, Lin YP, Wang CW, Tzeng HC, Wu CH, Chen YC, Chen CP, Chen LC, Wu YC. DNA-gold nanorod conjugates for remote control of localized gene expression by near infrared irradiation. *J Am Chem Soc* 2006, 128: 3709-3715.
- Chen CD, Cheng SF, Chau LK, Wang CRC. Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods. *Biosens Bioelectron* 2007, 22: 926-932.
- Cheng FY, Chen CT, Yeh CS. Comparative efficiencies of photothermal destruction of malignant cells using antibody-coated silica@Au nanoshells, hollow Au/Ag nanospheres and Au nanorods. *Nanotechnology* 2009, 20: 425104-425113.
- Cherukuri P, Glazer ES, Curley SA. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2010, 62: 339-345.
- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 2006, 6: 662-668.
- Chithrani DB. Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures. *Mol Membr Biol* 2010, 27: 299-311.
- Cho EC, Au L, Zhang Q, Xia Y. The effects of size, shape, and surface functional group of gold nanostructures on their adsorption and internalization by cells. *Small* 2010, 6: 517-522.
- Cho EC, Zhang Q, Xia Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 2011, 6: 385-391.

- Chou CH, Chen CD, Wang CRC. Highly efficient, wavelength-tunable, gold nanoparticle based optothermal nanoconvertors. *J Phys Chem B* 2005, 109: 11135-11138.
- Christians ES, Benjamin IJ. Heat shock response: Lessons from mouse knockouts. *Handb Exp Pharmacol* 2006, 172: 139-152.
- Chu Z, Huang Y, Tao Q, Li Q. Cellular uptake, evolution, and excretion of silica nanoparticles in human cells. *Nanoscale* 2011, 3: 3291-3299.
- Clinicaltrials.gov. Pilot study of AuroLase(tm) therapy in refractory and/or recurrent tumors of the head and neck. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00848042>; 2010.
- Cobley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y. Gold nanostructures: A class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem Soc Rev* 2011, 40: 44-56.
- Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 2005, 1: 325-327.
- Corsi K, Chellat F, Yahia L, Fernandes JC. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 2003, 24: 1255-1264.
- Craperi D, Vicat JM, Nissou MF, Mathieu J, Baudier J, Benabid AL, Verna JM. Increased bax expression is associated with cell death induced by Ganciclovir in a herpes thymidine kinase gene expressing glioma cell line. *Hum Gene Ther* 1999, 10: 679-688.
- Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev* 2004, 104: 293-346.
- Deckers R, Quesson B, Arsaut J, Eimer S, Couillaud F, Moonen CTW. Image-guided, noninvasive, spatiotemporal control of gene expression. *PNAS* 2009, 106: 1175-1180.
- Deguchi S, Yamazaki T, Mukai S, Usami R, Horikoshi K. Stabilization of C-60 nanoparticles by protein adsorption and its implications for toxicity studies. *Chem Res Toxicol* 2007, 20: 854-858.



Deguchi T, Itoh M, Urawa H, Matsumoto T, Nakayama S, Kawasaki T, Kitano T, Oda S, Mitani H, Takahashi T, Todo T, Sato J, Okada K, Hatta K, Yuba S, Kamei Y. Infrared laser-mediated local gene induction in medaka, zebrafish and arabidopsis thaliana. *Dev Growth Differ* 2009, 51: 769-775.

Del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: Transfection and intracellular trafficking in RPE cells. *Int J Pharm* 2008, 360: 177-183.

Destrée C, Nagy JB. Mechanism of formation of inorganic and organic nanoparticles from microemulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 2006, 126: 123-126.

Díaz B, Sánchez-Espinel C, Arruebo M, Faro J, de Miguel E, Magadan S, Yagüe C, Fernández-Pacheco R, Ibarra R, Santamaría J, González-Fernández A. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small* 2008, 4: 2025-2034.

Diaz RM, Bateman A, Emiliusen L, Fielding A, Trono D, Russell SJ, Vile RG. A lentiviral vector expressing a fusogenic glycoprotein for cancer gene therapy. *Gene Ther* 2000, 7: 1656-1563.

Duff DG, Baiker A. A new hydrosol of gold clusters. Formation and particle size variation. *Langmuir* 1993, 9: 2301-2309.

Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* 1997, 277: 1078-1081.

Ernest H, Shetty R. Impact of nanotechnology on Biomedical Sciences: Review of current concepts on convergence of nanotechnology with biology. *J Nanotechnol* 2005, 1: 1-14.

Eustis S, El-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Soc Rev* 2006, 35: 209-217.

Fakruddin Md, Hossain Z, Afroz H. Prospects and applications of nanobiotechnology: A medical perspective. *J Nanobiotechnology* 2012, 10: 31-45.

Faulk WP, Taylor G. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 1971, 8: 1081-1083.

Fernández Cabada T, Sánchez López de Pablo C, Martínez Serrano A, del Pozo Guerrero F, Serrano Olmedo JJ, Ramos Gomez M. Induction of cell death in a glioblastoma line by hyperthermic therapy based on gold nanorods. *Int J Nanomedicine* 2012, 7: 1511-1523.

Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro, B. Suicide gene therapy mediated by the herpes simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: Fifteen years of application. *Curr Gene Ther* 2003, 3: 13-26.

Gannon CJ, Cherukuri P, Yakobson BI, Cognet L, Kanzius JS, Kittrell C, Weisman RB, Pasquali M, Schmidt HK, Smalley RE, Curley SA. Carbon nanotube-enhanced thermal destruction of cancer cells in a noninvasive radiofrequency field. *Cancer* 2007, 110: 2654-2665.

Gao J, Xu B. Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today* 2009, 4: 37-51.

Gemeinhart RA, Luo D, Saltzman WM. Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *Biotechnol Prog* 2005, 21: 532-537.

Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60: 1307-1315.

Giouroudi I, Kosel J. Recent progress in biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Recent Pat Nanotechnol* 2010, 4: 111-118.

Glazer ES, Massey KL, Zhu C, Curley SA. Pancreatic carcinoma cells are susceptible to noninvasive radio frequency fields after treatment with targeted gold nanoparticles. *Surgery* 2010, 148: 319-324.

Gobin AM, Lee MH, Halas NJ, James WD, Drezek RA, West JL. Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. *Nano Lett* 2007, 7: 1929-1934.

Gobin AM, Moon JJ, West JL. EphrinA1-targeted nanoshells for photothermal ablation of prostate cancer cells. *Int J Nanomedicine* 2008, 3: 351-358.

- Godbey WT, Mikos AG. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *J Control Release* 2001, 72: 115-125.
- Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chem* 2004, 15: 897-900.
- Gourley PL. Brief overview of BioMicroNano technologies. *Biotechnol Prog* 2005, 21: 2-10.
- Grabar KC, Allison KJ, Baker BE, Bright RM, Brown KR, Freeman RG, Fox AP, Keating CD, Musick MD, Natan MJ. Two-dimensional arrays of colloidal gold particles: a flexible approach to macroscopic metal surfaces. *Langmuir* 1996, 12: 2353-2361.
- Griffin RJ, Dings RP, Jamshidi-Parsian A, Song CW. Mild temperature hyperthermia and radiation therapy: Role of tumour vascular thermotolerance and relevant physiological factors. *Int J Hyperthermia* 2010, 26: 256-263.
- Gupta S, Stafford RJ, Javadi S, Ozkan E, Ensor JE, Wright KC, Elliot AM, Jian Y, Serda RE, Dixon KA, Miller JJ, Klump S, Wallace MJ, Li C. Effects of near-infrared laser irradiation of biodegradable microspheres containing hollow gold nanospheres and paclitaxel administered intraarterially in a rabbit liver tumor model. *J Vasc Interv Radiol* 2012, 23: 553-561.
- Han G, Ghosh P, Rotello VM. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery. *Nanomedicine* 2007, 2: 113-123.
- Heister E, Lamprecht C, Neves V, Tilmacius C, Datas L, Flahaut E, Soula B, Hinterdorfer P, Coley HM, Silva SR, McFadden J. Higher dispersion efficacy of functionalized carbon nanotubes in chemical and biological environments. *ACS Nano* 2010, 4: 2615-2626.
- Hirsch LR, Gobin AM, Lowery AR, Tam F, Drezek RA, Halas NJ, West JL. Metal nanoshells. *Ann Biomed Eng* 2006, 34: 15-22.
- Hirsch LR, Jackson JB, Lee A, Halas NJ, West JL. A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Anal Chem* 2003, 75: 2377-2381.

Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. PNAS 1998, 95: 4607-4612.

Hong C, Lee J, Zheng H, Hong SS, Lee C. Porous silicon nanoparticles for cancer photothermal therapy. Nanoscale Res Lett 2011, 6: 321-329.

<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>

Hu C, Peng Q, Chen F, Zhong Z, Zhuo R. Low molecular weight polyethylenimine conjugated gold nanoparticles as efficient gene vectors. Bioconjugate Chem 2010, 21: 836-844.

Huang XH, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed M.A. Gold nanoparticles: Interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostic and therapy. Nanomedicine 2007, 2: 681-693.

Huff TB, Tong L, Zhao Y, Hansen MN, Cheng JX, Wei A. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. Nanomedicine (Lond) 2007, 2: 125-132.

Huo Q, Liu J, Wang LQ, Jiang Y, Lambert TN, Fang E. A new class of silica cross-linked micellar core-shell nanoparticles. J Am Chem Soc 2006, 128: 6447-6453.

Hurwitz MD. Today's thermal therapy: Not your father's hyperthermia: Challenges and opportunities in application of hyperthermia for the 21st century cancer patient. Am J Clin Oncol 2010, 33: 96-100.

Huschka R, Zuloaga J, Knight MW, Brown LV, Nordlander P, Halas NJ. Light-induced release of DNA from gold nanoparticles: Nanoshells and nanorods. J Am Chem Soc 2011, 133: 12247-12255.

Hussain N, Thickett KR, Na H, Leung C, Tailor CS. Feline leukemia virus infection requires a post-receptor binding envelope-dependent cellular component. J Virol 2011, 85: 12529-12536.

Inagaki S, Fukushima Y, Kuroda K. Synthesis of highly ordered mesoporous materials from a layered polysilicate. J Chem Soc, Chem Commun 1993, 8: 680-682.

Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem BC, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner CM, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Jauch KW, Dürr

- HR, Ploner F, Baur-Melnyk A, Mansmann U, Hiddemann W, Blay JY, Hohenberger, P. Neoadjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localized high-risk soft-tissue sarcoma: A randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol* 2010, 11: 561-570.
- Jain KK. Nanomedicine: Application of nanobiotechnology in medical practice. *Med Princ Pract* 2008, 17: 89-101.
- Jain PK, El-Sayed IV, El-Sayed MA. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today* 2007, 2: 18-29.
- Ji X, Shao R, Elliott AM, Stafford RJ, Esparza-Coss E, Bankson JA, Liang G, Luo ZP, Park K, Markert JT, Li C. Bifunctional gold nanoshells with a superparamagnetic iron oxide-silica core suitable. *J Phys Chem C* 2007, 111: 6245-6251.
- Johannsen M, Thiesen B, Wust P, Jordan A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *Int J Hyperthermia* 2010, 26: 790-795.
- Katz E, Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angew Chem Int Ed* 2004, 43: 6042-6108.
- Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J Phys Chem B* 2003, 107: 668-677.
- Kelsall R, Hamley I, Geoghegan M. Nanoscale science and technology. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2005.
- Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies. *Chem Soc Rev* 2011, 40: 1647-1671.
- Khosroshahi M, Ghazanfari L. Physicochemical characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/Au multilayer nanostructure. *Mater Chem Phys* 2012, 133: 55-62.
- Kim J, Park S, Lee JE, Jin SM, Lee JH, Lee IS, Yang I, Kim JS, Kim SK, Cho MH, Hyeon T. Designed fabrication of multifunctional magnetic gold nanoshells and their application to magnetic resonance imaging and photothermal therapy. *Angew Chem Int Ed* 2006, 45: 7754-7758.

Kim K, Lee HB, Lee JW, Park HK, Shin KS. Self-assembly of poly(ethylenimine)-capped Au nanoparticles at a toluene-water interface for efficient surface enhanced Raman scattering. *Langmuir* 2008, 24: 7178-83.

Kirui DK, Rey DA, Batt CA. Gold hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging. *Nanotechnology* 2010, 21: 105105-105115.

Kneuer C, Sameti M, Bakowsky U, Schiestel T, Schirra H, Schmidt H, Lehr CM. A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. *Bioconjugate Chem* 2000, 11: 926-932.

Kozlowski A, Harris JM. Improvements in protein PEGylation: Pegylated interferons for treatment of hepatitis C. *J Control Release* 2001, 72: 217-224.

Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* 1992, 359: 710-712.

Krishnan S, Diagaradjane P, Cho S. Nanoparticle-mediated thermal therapy: Evolving strategies for prostate cancer therapy. *Int J Hyperthermia* 2010, 26: 775-789.

Kulak A, Lee YJ, Park YS, Yoon KB. Orientation controlled monolayer assembly of zeolite crystals on glass and mica by covalent linkage of surface-bound epoxide and amine groups. *Angew Chem Int Ed* 2000, 39: 950-953.

Kumar MV, Sameti M, Mohapatra SS, Kong X, Lockey RF, Bakowsky U, Lindeblatt G, Schmidt H, Lehr CM. Cationic silica nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo. *J Nanosci Nanotech* 2004, 7: 876-881.

Kumar R, Maitra AN, Patanjali PK, Sharm P. Hollow gold nanoparticles encapsulating horseradish peroxidase. *Biomaterials* 2005, 26: 6743-6753.

Langford G, Dayan A, Yla-Herttuala S, Eckland D. A preclinical assessment of the safety and biodistribution of an adenoviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene (Cerepro) after intracerebral administration. *J Gene Med* 2009, 11: 468-476.

Laszlo A. The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function. *Cell Prolif* 1992, 25: 59-87.

- le Masne de Chermont Q, Chaneac C, Seguin J, Pelle F, Maitrejean S, Jolivet JP, Gourier D, Bessodes M, Scherman D. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for *in vivo* imaging. PNAS 2007, 104: 9266-9271.
- Lee CC, Mackay JA, Fréchet JM, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. Nat Biotechnol 2005, 23: 1517-1526.
- Lee SE, Sasaki DY, Perroud TD, Yoo D, Patel KD, Lee LP. Biologically functional cationic phospholipid-gold nanoplasmonic carriers of RNA. J Am Chem Soc 2009, 131: 14066-14074.
- Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Citotoxicity of nanoparticles. Small 2008, 4: 26-49.
- Li P, Li D, Zhang L, Li G, Wang E. Cationic lipid bilayer coated gold nanoparticles-mediated transfection of mammalian cells. Biomaterials 2008, 29: 3617-3624.
- Li Z, Huang P, Zhang X, Lin J, Yang S, Liu B, Gao F, Xi P, Ren Q, Cui D. RGD-conjugated dendrimer-modified gold nanorods for *in vivo* tumor targeting and photothermal therapy. Mol Pharm 2010, 7: 94-104.
- Liang HP, Wan LJ, Bai CL, Jiang L. Gold hollow nanospheres: Tunable surface plasmon resonance controlled by interior-cavity sizes. J Phys Chem B 2005, 109: 7795-7800.
- Link S, El-Sayed MA. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. J Phys Chem B 1999, 103: 8410-8426.
- Liu X, Dai Q, Austin L, Coutts J, Knowles G, Zou J, Chen H, Huo Q. A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering. J Am Chem Soc 2008, 130: 2780-2782.
- Liu Z, Robinson JT, Sun X, Dai H. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. J Am Chem Soc 2008, 130: 10876-10877.
- Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Field MR, Ianuzzo SE, Ianuzzo CD. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. Am J Physiol 1995, 268: C1387-C1394.
- Lowery AR, Gobin AM, Day ES, Halas NJ, West JL. Immunonanoshells for targeted photothermal ablation of tumor cells. Int J Nanomedicine 2006, 1: 149-154.

- Lu J, Liong M, Zink JJ, Tamanoi F. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. *Small* 2007, 3: 1341-1346.
- Lu W, Melancon MP, Xiong C, Huang Q, Elliott A, Song S, Zhang R, Flores LG, Gelovani JG, Wang LV, Ku G, Stafford RJ, Li C. Effects of photoacoustic imaging and photothermal ablation therapy mediated by targeted hollow gold nanospheres in an orthotopic mouse xenograft model of glioma. *Cancer Res* 2011, 71: 6116-6121.
- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cerdervall, Dawson A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *PNAS* 2008, 105: 14265-14270.
- Luo D, Saltzman WM. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat Biotechnol* 2000, 18: 893-895.
- Luo D, Saltzman WM. Thinking of silica. *Gene Ther* 2006, 13: 585-586.
- Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2011, 103: 317-324.
- Manthe RL, Foy SP, Krishnamurthy N, Sharma B, Labhasetwar V. Tumor Ablation and Nanotechnology. *Mol Pharm* 2010, 7: 1880-1898.
- Martin CR, Mitchell DT. Highly sensitive methods for electroanalytical chemistry based on nanotubule membranes. *Anal Chem* 1999, 71: 3665-3672.
- Martín-Saavedra FM, Ruíz-Hernández E, Boré A, Arcos D, Vallet-Regí M, Vilaboa N. Magnetic mesoporous silica spheres for hyperthermia therapy. *Acta Biomater* 2010, 6: 4522-4531.
- Medina-Kauwe LK, Xie J, Hamm-Alvarez S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther* 2005, 12: 1734-1751.
- Melancon MP, Lu W, Yang Z, Zhang R, Cheng Z, Elliot AM, Stafford J, Olson T, Zhang JZ, Li C. *In vitro* and *in vivo* targeting of hollow gold nanoshells directed at epidermal growth factor receptors for photothermal ablation. *Mol Cancer Ther* 2008, 7: 1730-1739.



Melancon MP, Lu W, Zhong M, Zhou M, Liang G, Elliott AM, Hazle JD, Myers JN, Li C, Stafford RJ. Targeted multifunctional gold-based nanoshells for magnetic resonance-guided laser ablation of head and neck cancer. *Biomaterials* 2011, 32: 7600-7608.

Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF. Liposome-cell interactions in vitro: Effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* 1998, 37: 12875-12883.

Miyako E, Deguchi T, Nakajima Y, Yudasaka M, Hagiwara Y, Horie M, Shichiri M, Higuchi Y, Yamashita F, Hashida M, Shigeri Y, Yoshida Y, Iijima S. Photothermic regulation of gene expression triggered by laser-induced carbon nanohorns. *PNAS* 2012, 109: 7523-7528.

Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes Develop* 1998, 12: 3788-3796.

Moros EG, Peñagaricano J, Novák P, Straube WL, Myerson RJ. Present and future technology for simultaneous superficial thermoradiotherapy of breast cancer. *Int J Hyperthermia* 2010, 26: 699-709.

Mutsaers SE, Papadimitriou JM. Surface charge of macrophages and their interaction with charged particles. *J Leukoc Biol* 1998, 44: 17-20.

Na HK, Kim MH, Park K, Ryoo SR, Lee KE, Jeon H, Ryoo R, Hyeon C, Min DH. Efficient functional delivery of siRNA using mesoporous silica nanoparticles with ultralarge pores. *Small* 2012, 8: 1752-1761.

Nalwa HS. Handbook of nanostructured materials and nanotechnology. Academic Press, San Diego, California, USA, 1999.

Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* 2003, 301: 1884-1886.

Ni W, Kou X, Yang Z, Wang J. Tailoring longitudinal surface plasmon wavelengths, scattering and absorption cross sections of gold nanorods. *ACSNano* 2008, 2: 677-686.

Niidome T, Nakashima K, Takahashi H, Niidome Y. Preparation of primary amine-modified gold nanoparticles and their transfection ability into cultivated cells. *Chem Commun* 2004: 1978-1979.

Noh SM, Kim WK, Kim SJ, Kim JM, Baek KH, Oh YK. Enhanced cellular delivery and transfection efficiency of plasmid DNA using positively charged biocompatible colloidal gold nanoparticles. *Biochem Biophys Acta* 2007, 1770: 747-752.

Oldenburg SJ, Avertitt RD, Westcott SL, Halas NJ. Nanoengineering of optical resonances. *Chem Phys Lett* 1998, 288: 243-247.

Osada K, Christie RJ, Kataoka K. Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery. *J R Soc Interface* 2009, 6: S325-S339.

Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, Tamarkin L. Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv* 2004, 11: 169-183.

Park IY, Kim IY, Yoo MK, Choi YJ, Cho MH, Cho CS. Mannosylated polyethylenimine coupled mesoporous silica nanoparticles for receptor-mediated gene delivery. *Int J Pharma* 2008, 359: 280-287.

Peng SF, Su CJ, Wei MC, Chen CY, Liao ZX, Lee PW, Chen HL, Sung HW. Effects of the nanostructure of dendrimer/DNA complexes on their endocytosis and gene expression. *Biomaterials* 2010, 31: 5660-5670.

Pissuwan D, Valenzuela SM, Cortie MB. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *TRENDS in Biotechnol* 2006, 24: 62-67.

Popat A, Hartono BH, Stahr F, Liu J, Qiao SZ, Lu GQ. Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilization and delivery carriers. *Nanoscale* 2011, 3: 2801-2818.

Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999, 6: 99-104.

Pouton CW, Seymour LW. Key issues in non-viral gene delivery. *Adv Drug Deliv* 2001, 46: 187-203.

Prabha S, Zhou WZ, Panyam J, Labhasetwar V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm* 2002, 244: 105-115.

Preciado-Flores S, Wang D, Wheeler DA, Newhouse R, Hensel JK, Schwartzberg A, Wang L, Zhu J, Barboza-Flores M, Zhang, JZ. Highly reproducible synthesis of hollow gold nanospheres with near infrared surface plasmon absorption using PVP as stabilizing agent. *J Mater Chem* 2011, 21: 2344-2350.

Puvanakrishnan P, Park J, Chatterjee D, Krishnan S, Tunnell JW. In vivo tumor targeting of gold nanoparticles: Effect of particle type and dosing strategy. *Int J Nanomedicine* 2012, 7: 1251-1258.

Radu DR, Lai CY, Jeftinija K, Rowe EW, Jeftinija S, Lin VSY. A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent. *J Am Chem Soc* 2004, 126: 13216-13217.

Raffa V, Gherardini L, Vittorio O, Bardi G, Ziaei A, Pizzorusso T, Riggio C, Nitodas S, Karachalios T, Al-Jamal KT, Kostarelos K, Costa M, Cuschieri A. Carbon nanotube-mediated wireless cell permeabilization: Drug and gene uptake. *Nanomedicine (Lond)* 2011, 6: 1709-1718.

Raoof M, Curley SA. Non-invasive radiofrequency-induced targeted hyperthermia for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol* 2011, 2011: 676957-676963.

Ratto F, Matteini P, Centi S, Rossi F, Pini R. Gold nanorods as new nanochromophores for photothermal therapies. *J Biophoton* 2011, 4: 64-73.

Rayavarapu RG, Petersen W, Hartsuiker L, Chin P, Janssen H, van Leeuwen FW, Otto C, Manohar S van Leeuwen TG. *In vitro* toxicity studies of polymer-coated gold nanorods. *Nanotechnology* 2010, 21: 145101-145119.

Robe PA, Princen F, Martin D, Malgrange B, Stevenaert A, Moonen G, Gielen J, MervilleM, Bours V. Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase/Ganciclovir gene therapy system: Effects of dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate, alpha-glycyrrhetinic acid, and cytosine arabinoside. *Biochem Pharmacol* 2000, 60: 241-249.

Robertson D, Paterson HE, Adamson P, Hall A, Monaghan P. Ultrastructural localization of ras-related proteins using epitope-tagged plasmids. *J Histochem Cytochem* 1995, 43: 471-480.

Robson T, Hirst DG. Transcriptional targeting in cancer gene therapy. *J Biomed Biotechnol* 2003, 2: 110-137.

Roesler S, Koch F, Schmehl T, Weissmann N, Seeger W, Gessler T, Kissel T. Amphiphilic, low molecular weight poly(ethylene imine) derivatives with enhanced stability for efficient pulmonary gene delivery. *Gene Med* 2011, 13: 123-133.

Rosenholm JM, Peuhu E, Eriksson JE, Sahlgren C, Linde'n, M. Targeted intracellular delivery of hydrophobic agents using mesoporous hybrid silica nanoparticles as carrier systems. *Nano Lett* 2009, 9: 3308-3311.

Rosenthal SJ, Chang JC, Kovtun O, McBride JR, Tomlinson ID. Biocompatible quantum dots for biological applications. *Chem Biol* 2011, 18: 10-24.

Rostro-Kohanloo BC, Bickford LR, Payne CM, Day ES, Anderson LJE, Zhong M, Lee S, Mayer KM, Zal T, Adam L, Dinney CPN, Drezek RA, West JL, Hafner JH. The stabilization and targeting of surfactant-synthesized gold nanorods. *Nanotechnology* 2009, 20: 434005-434015.

Sager TM, Porter DW, Robinson VA, Lindsley WG, Schwegler-Berry DE, Castranova V. Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology* 2007, 1: 118-129.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Appendix 8: Commonly used techniques in molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor 2001, 3rd ed., vol. 3

Sandhu KK, McIntosh CM, Simard JM, Smith SW, Rotello VM. Gold nanoparticle-mediated transfection of mammalian cells. *Bioconjug Chem* 2002, 13: 3-6.

Santra S, Wang K, Tapeç R, Tan W. Development of novel dye-doped silica nanoparticles for biomarker application. *J Biomed Opt* 2001, 6: 160-166.

Schaffer DV, Fidelman NA, Dan N, Lauffenburger DA. Vector unpacking as a potential barrier for receptor mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol Bioeng* 2000, 67: 598-606.

Schwartzberg AM, Olson TY, Talley CE, Zhang JZ. Synthesis, characterization, and tunable optical properties of hollow gold nanospheres. *J Phys Chem B* 2006, 110: 19935-19944.

Shi Kam NW, O'Connell M, Wisdom JA, Dai H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *PNAS* 2005, 102: 11600-11605.

Shim MS, Kwon YJ. Stimuli-responsive polymers and nanomaterials for gene delivery and imaging applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2012, 64: 1046-1059.

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir* 2005, 21: 10644-10654.

Silva AC, Oliveira TR, Mamani JB, Malheiros SM, Malavolta L, Pavon LF, Sibov TT, Amaro E Jr, Tannús A, Vidoto EL, Martins MJ, Santos RS, Gamarra LF. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *Int J Nanomedicine* 2011, 6: 591-603.

Simpson CR, Kohl M, Essenpreis M, Cope M. Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. *PBM* 1998, 43: 2465-2478.

Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VSY. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliver Rev* 2008, 60: 1278-1288.

Son SJ, Bai X, Lee SB. Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine. Part 1. Drug/Gene delivery applications. *Drug Discov Today* 2007, 12: 650-656.

Sonawane ND, Szoka FC, Verkman S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem* 2003, 278: 44826-31.

Sonawane ND, Szoka FC, Verkman S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem* 2003, 278: 44826-44831.

Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodispersed silica spheres in micron size range. *J Colloid Interface Sci* 1968, 26: 62-68.

Stoeva SI, Huo F, Lee JS, Mirkin CA. Three-layer composite magnetic nanoparticle probes for DNA. *J Am Chem Soc* 2005, 127: 15362-15363.

Takahashi H, Niidome Y, Niidome T, Kaneko K, Kawasaki H, Yamada H. Modification of gold nanorods using phosphatidylcholine to reduce cytotoxicity. *Langmuir* 2006, 22: 2-5.

Tan K, Cheang P, Ho I, Lam P, Hui KM. Nanosized bioceramic particles could function as efficient gene delivery vehicles with target specificity for the spleen. *Gene Ther* 2007, 14: 828-835.

Tandon M, Vikram Vemula S, Mittal SK. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 2011, 15: 31-51.

Tantra R, Tompkins J, Quincey P. Characterisation of the de-agglomeration effects of bovine serum albumin on nanoparticles in aqueous suspension. *Colloid Surf B Biointerf* 2010, 75: 275-281.

Thomas M, Klibanov AM. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *PNAS* 2003, 100: 9138-9143.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998, 281: 1312-1316.

Tolnai G, Csempesz F, Kabai-Faix M, Kalman E, Keresztes Z, Kovacs AL, Ramsden JJ, Hórvölgyi Z. Preparation and characterization of surface-modified silica nanoparticles. *Langmuir* 2001, 17: 2683-2687.

Torney F, Trewyn BG, Lin VSY, Wang K. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nat Nanotechnol* 2007, 2: 295-300.

Uboldi C, Bonacchi D, Lorenzi G, Hermanns MI, Pohl C, Baldi G, Unger RE, Kirkpatrick CJ. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol* 2009, 6: 18-30.

van der Aa MA, Mastrobattista E, Oosting RS, Hennink WE, Koning GA, Crommelin DJA. The nuclear pore complex: The gateway to successful nonviral gene delivery. *Pharm Res* 2006, 23: 447-459.

van der Zee J. Heating the patient: A promising approach? *Ann Oncol* 2002, 13: 1173-1184.

van Putten EH, Dirven CM, van den Bent MJ, Lamfers ML. Sitimagene ceradenovec: A gene-based drug for the treatment of operable high-grade glioma. *Future Oncol* 2010, 6:1691-710.

Vega RA, Wang Y, Harvat T, Wang S, Qi M, Adewola AF, Lee D, Benedetti E, Oberholzer J. Modified gold nanoparticle vectors: A biocompatible intracellular delivery system for pancreatic islet cell transplantation. *Surgery* 2010, 148: 858-865.

Vilaboa N, Fenna M, Munson J, Roberts SM, Voellmy R. Novel gene switches for targeted and timed expression of proteins of interest. *Mol Ther* 2005, 12: 290-298.

Vilaboa N, Voellmy R. Regulatable gene expression systems for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2006, 6: 421-438.

von Maltzahn G, Park J, Agrawal A, Bandaru NK, Das SK, Sailor MJ, Bhatia SN. Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas. *Cancer Res* 2009, 69: 3892-3910.

Wang Y, Gao S, Ye WH, Yoon HS, Yang YY. Co-delivery of drugs and DNA from cationic core-shell nanoparticles self-assembled from a biodegradable copolymer. *Nat Mater* 2006, 5: 791-796.

Wattiaux R, Laurent N, Conninck SW, Jadot M. Endosomes, lysosomes: Their implication in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 2000, 41: 201-208.

Welch A, van Gemert M. Optical-thermal response of laser-irradiated tissue. Plenum Press, New York, 1995.

Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 2003, 24: 1001-1011.

Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2002, 3: 487-497.

Xia T, Kovoichich M, Liong M, Meng H, Kabehie S, George S, Zink JI, Nel AE. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica

nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS Nano* 2009, 3: 3273-3286.

Xiang JJ, Tang JQ, Zhu SG, Nie XM, Lu HB, Shen SR, Li XL, Tang K, Zhou M, Li GY. IONP-PLL: A novel nonviral vector for efficient gene delivery. *J Gene Med* 2003, 5: 803-817.

Xie J, Huang J, Li X, Sun S, Chen X. Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications. *Curr Med Chem* 2009, 16: 1278-1294.

Xing X, He X, Peng J, Wang K, Tan W. Uptake of silica-coated nanoparticles by HeLa cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2005, 5: 1688-1693.

Xu X-HN, Brownlow WJ, Kyriacou SV, Wan Q, Viola JJ. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochem* 2004, 43: 10400-10413.

Yagüe C, Arruebo M, Santamaria J. NIR-enhanced drug release from porous Au/SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chem Commun* 2010, 46: 7513-7515.

Yagüe C, Moros M, Grazú V, Arruebo M, Santamaría J. Synthesis and stealthing study of bare and PEG-ylated silica micro- and nanoparticles as potential drug-delivery vectors. *Chem Eng J* 2008, 137: 45-53.

Yang DP, Cui DX. Advances and prospects of gold nanorods. *Chem Asian J* 2008, 3: 2010-2022.

Yiu HHP, McBain SC, El Haj AJ, Dobson J. A triple-layer design for polyethyleneimine-coated, nanostructured magnetic particles and their use in DNA binding and transfection. *Nanotechnology* 2007, 18: 435601-435607.

Yokoyama T, Tam J, Kuroda S, Scott AW, Aaron J, Larson T, Shanker M, Correa AM, Kondo S, Roth JA, Sokolov K, Ramesh R. EGFR-targeted hybrid plasmonic magnetic nanoparticles synergistically induce autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PLoS ONE* 2011, 6: 25507-25520.

You J, Zhang G, Li C. Exceptionally high payload of Doxorubicin in hollow gold nanospheres for near-infrared light-triggered drug release. *ACS Nano* 2010, 4: 1033-1041.



Yu J, Zhao H, Ye L, Yang H, Ku S, Yang N, Xiao N. Effect of surface functionality of magnetic silica nanoparticles on the cellular uptake by glioma cells in vitro. *J Mater Chem* 2009, 19: 1265-1270.

Zeng W, Qian XF, Zhang YB, Yin J, Zhu ZK. Organic modified mesoporous MCM-41 through solvothermal process as drug delivery system. *Mater Res Bull* 2005, 40: 766-772.

Zeng Y, Cullen BR. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 2002, 8: 855-860.

Zhang J, Dewilde AH, Chinn P, Foreman A, Barry S, Kanne D, Braunhut SJ. Herceptin-directed nanoparticles activated by an alternating magnetic field selectively kill HER-2 positive human breast cells in vitro via hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2011, 27: 682-697.

Zhang X, Yin L, Tang M, Pu Y. Optimized methos for preparation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles dispersion for biological study. *J Nanosci Nanotechnol* 2010, 10: 5213-5219.

Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science* 1998, 279: 548-552.

Zhou X, Zhang X, Yu X, Zha X, Fu Q, Liu B, Wang X, Chen Y, Chen Y, Shan Y, Jin Y, Wu Y, Liu J, Kong W, Shen J. The effect of conjugation to gold nanoparticles on the ability of low molecular weight chitosan to transfer DNA vaccine. *Biomaterials* 2008, 29: 111-117.



## ***APÉNDICE***



Los datos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido empleados en la elaboración de las siguientes publicaciones científicas:

- Cebrián V, Yagüe C, Arruebo M, Martín-Saavedra FM, Santamaría J, Vilaboa N. On the role of the colloidal stability of mesoporous silica nanoparticles as gene delivery vectors. *J Nanopar Res*, 2011; 13: 4097-4108.
- Cebrián V, Martín-Saavedra FM, Yagüe C, Arruebo M, Santamaría J, Vilaboa N. Size-dependent transfection efficiency of PEI-capped gold nanoparticles. *Acta Biomater* 2011; 7: 3645-55.
- Cebrián V, Martín-Saavedra FM, Gómez L, Arruebo M, Santamaría J, Vilaboa N. Enhancing of plasmonic photothermal therapy through heat-inducible transgene activity. Preaceptado condicionalmente en *Nanomedicine* (2012).